

# PROTOPLASMA

UNTER BESONDERER MITWIRKUNG VON

**ROBERT CHAMBERS** UND **WILLIAM SEIFRIZ**  
NEW YORK PHILADELPHIA

HERAUSGEGEBEN VON

**JOSEF SPEK** UND **FRIEDL WEBER**  
ROSTOCK GRAZ

BAND XLII, HEFT 2  
MIT 33 TEXTABBILDUNGEN  
ABGESCHLOSSEN AM 18. FEBRUAR 1953



**WIEN**  
**SPRINGER-VERLAG**  
1953

Protoplasma

Die Zeitschrift

**Protoplasma**

erscheint zwanglos in einzeln berechneten Heften wechselnden Umfanges, die zu Bänden von 600 bis 640 Seiten vereinigt werden.

Die Zeitschrift veröffentlicht Originalarbeiten, kurze Mitteilungen, Sammelreferate und kritische Referate aus allen Teilen der Protoplasmaforschung.

Manuskripte sowie alle auf die Redaktion bezüglichen Anfragen sind an

Prof. Dr. Fr. Weber, Pflanzenphysiologisches Institut,  
Graz, Schubertstraße 51, Österreich

oder an

Prof. Dr. J. Spek, Zoologisches Institut,  
(3a) Rostock, Universitätsplatz, Deutschland, DDR

zu senden; alle geschäftlichen Mitteilungen an den

Springer-Verlag in Wien I, Mülkerbastei 5.

Die Manuskripte sollen mit der Maschine geschrieben sein. Den Abhandlungen ist eine Zusammenfassung beizufügen, die Literatur ist nicht in Form von Fußnoten, sondern am Ende der Arbeit in Listenform anzuführen.

Die Manuskripte sind vollständig druckreif und in fehlerfreier Sprache einzusenden, so daß bei der Korrektur nur Satzfehler verbessert zu werden brauchen. Überschreiten die Autorkorrekturen 10% der Satzkosten, hat der Autor das Mehr zu tragen.

Die Vorlagen für die Abbildungen müssen vollkommen nachbildungsfertig abgeliefert werden. Kosten für etwa nötige Umzeichnungen werden dem Verfasser in Rechnung gestellt. Die Abbildungen sind auf das unbedingt notwendige Maß zu beschränken. Für die Reproduktion besonders reichen Illustrationsmaterials ist ein Unkostenbeitrag zu leisten.

Bedingung der Aufnahme von Arbeiten ist: möglichst kurze Fassung des Textes. Die Beiträge sollen den Umfang von 1½ Druckbogen (24 Seiten) nicht überschreiten.

Die Aufnahme von Artikeln, welche bereits an anderer Stelle in wörtlich oder auch nur inhaltlich gleicher Fassung publiziert worden sind, wird abgelehnt. „Vorläufige Mitteilungen“ und Auseinandersetzungen polemischen Inhalts werden nicht angenommen. Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht, und zwar bis zum 31. Jänner desjenigen Jahres, das auf das Jahr des Erscheinens folgt. Der Verfasser verpflichtet sich also, innerhalb dieser Frist seinen im Protoplasma abgedruckten Beitrag nicht anderweitig zu veröffentlichen.

Die Abhandlungen, kurzen Mitteilungen, Sammelreferate und Referate können in den Sprachen der internationalen biologischen Kongresse verfaßt sein.

Die Verfasser erhalten 100 Sonderdrucke ihrer Beiträge kostenlos und können weitere (bis zu 300) gegen angemessene Berechnung beziehen. Unkostenersatz wird nur für Sammelreferate geleistet.

**Springer-Verlag, Wien I, Mülkerbastei 5**

Fernsprecher: U 36-5-60 Serie — Telegrammadresse: Springerbuch Wien

**XLII. Band**

**Inhaltsverzeichnis**

**2. Heft**

Abhandlungen

Seite

<b>Seemann, F.:</b> Der Einfluß von Neutralsalzen und Nichtleitern auf die Wasserpermeabilität des Protoplasmas .....	109
<b>Kuhl, W.:</b> Untersuchungen über die Cytodynamik der Plasmogamie und temporären „Plasmabrücken“ bei <i>Actinosphaerium eichhorni</i> Ehrbg. unter Änderung des Zeitfaktors mittels des Zeitrasterfilms .....	133
<b>Biebl, R.:</b> Resistenz pflanzlicher Plasmen gegen 2,4-D .....	193
<b>Kinzel, H.:</b> Die Bedeutung der Pektin- und Zellulosekomponente für die Lage des Entladungspunktes pflanzlicher Zellwände .....	209
<b>Wohlfahrt-Bottermann, K.-E., und G. Pfefferkorn:</b> Protistenstudien V. Zur Struktur des Wimperapparates .....	227
<b>Weber, F., Griseldis Kenda und Irmtraud Thaler:</b> Eiweißspindeln und cytoplasmatische Einschlusskörper in <i>Pereskioopsis</i> .....	239
<b>Kenda, Griseldis, Irmtraud Thaler und F. Weber:</b> Schließzellen-Chloroplasten vergilben nicht .....	246

Sammelreferate

<b>Mirimanoff, A.:</b> Le comportement de la cellule végétale en présence de toxiques additionnées de substances tensio-actives .....	250
<b>Weier, T. E.:</b> The Cytology of Leaf Homogenates .....	260

Fortsetzung auf der III. Umschlagseite







# Der Einfluß von Neutralsalzen und Nichtleitern auf die Wasserpermeabilität des Protoplasmas

Von

Felix Seemann

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien

Mit 7 Textabbildungen

(Eingelangt am 5. November 1952)

## Einleitung

Mit den Untersuchungen über die Permeation von gelösten Stoffen durch das Plasma wurde der Grundstein der Permeabilitätsforschung gelegt. Es darf daher nicht weiter verwundern, wenn in den ersten Jahrzehnten das Hauptaugenmerk auf die Erforschung der Plasmapermeabilität von Salzen und Nichtleitern gerichtet war, während der Permeation des Wassers kaum Beachtung und wenig Bedeutung geschenkt wurde. Wenngleich die ersten Arbeiten aus dem Gebiet der Wasserpermeabilität (Krabbe 1896, van Rysselberghe 1901) bis in die Zeit der Jahrhundertwende zurückreichen und später Autoren, wie Fitting (1915), Delf (1916), Stiles und Jörgensen (1917), wertvolle Beiträge lieferten, stammen die wichtigsten Ergebnisse doch erst aus Veröffentlichungen der letzten Jahrzehnte.

Die Beeinflussung der Wasserpermeabilität durch Außenfaktoren chemischer und physikalischer Natur wurde schon in einer Reihe von Arbeiten behandelt, so in denen von de Haan (1933, 1935), Levitt-Scarath-Gibbs (1936), Biebl (1942), Brauner (1943), Toth (1949), Seemann (1950 a, b), Guttenberg-Beythien (1951). Ausgehend von den Untersuchungen de Haans (1933, 1935), der zum erstenmal Klarheit in die Streitfrage über die Wirkung der Salze auf die Permeabilität bringen konnte, behandelt die vorliegende Arbeit die Wirkung von Salzen und Nichtleitern. Die Mehrzahl der Versuche stammt aus den Jahren 1948 und 1949, mehrere kleinere Versuchsreihen sind in den folgenden Jahren dazu gekommen. Die Zellen der Versuchsobjekte (Wasserblätter von *Salvinia natans*, Innenepidermis von *Allium cepa*) wurden in hypotonischen Lösungen von Salzen ( $\text{KNO}_3$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{SrCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ ) oder Nichtleitern (Harnstoff, Traubenzucker) vorbehandelt und sodann die Geschwindigkeit der plasmolytischen Verkleinerung bzw. Wiederausdehnung der Protoplaste gemessen. Zum Vergleiche dienten unbehandelte Kontrollzellen.

Der Einfluß der Salze auf die Wasserpermeabilität des Plasmas steht in enger Verbindung mit der Intrabilität oder Salzaufnahme in das Plasma. Dies kommt besonders deutlich durch die nachhaltende Wirkung des Salzeinflusses, wie sie Weber (1924) beschrieben hat, zum Ausdruck, welche selbst bei folgender Plasmolyse in einem Nichtleiter noch klar zu erkennen ist. Wenn über den Grad

und die Art des Einflusses ein und desselben Salzes (z. B. Kalzium) bei den verschiedenen Autoren (Cholodny-Sankewitsch 1933, Gellhorn 1929, Lepeschkin 1924, 1938, Weber 1924) oft diametral entgegengesetzte Meinungen herrschten, so konnte, wie bereits oben erwähnt, de Haan einen Teil dieser Widersprüche einer befriedigten Erklärung zuführen; denn aus seinen Versuchen ergab sich, daß Salze mit mehrwertigem Kation in schwacher Konzentration die Wasserpermeabilität hemmen, in stärkeren Konzentrationen jedoch erhöhen. Von dieser Beobachtung ausgehend, galt es hier in gleicher Weise die Wirkungen einiger Nichtleiter zu untersuchen. Sind doch, wie in zwei vorhergehenden Arbeiten (Seemann 1950 a, b) gezeigt werden konnte, vermutlich Veränderungen der inneren Plasmastruktur für die Wasserpermeabilität in erster Linie verantwortlich. Die Vorbehandlung der Zellen in hypotonischen Lösungen und die nachfolgende Messung in reinen (d. h. das untersuchte Agens nicht enthaltende) Plasmolytischen kann als gegenseitige Permeation des untersuchten Agens angesehen werden. Die Anwendbarkeit des Fickschen Diffusionsgesetzes auf Permeationsvorgänge (wie Plasmolyse, Deplasmolyse und gegenseitige Permeation) hat Bochsler (1948) mathematisch geprüft und im besonderen Falle für die Wasserpermeabilität experimentell bestätigt gefunden.

Aus diesem Grunde wurde in der vorliegenden Arbeit neben der spezifischen Wirkung verschieden stark hypotonischer Konzentration vor allem der Wirkungszeit und der daraus folgenden Beeinflussung der Wasserpermeabilität besonderes Augenmerk geschenkt.

#### Methodik

Die Messung und Berechnung der Eintritts- und Rückgangsgeschwindigkeit der Plasmolyse erfolgte, wie in den zwei vorhergehenden Arbeiten (Seemann 1950 a, b) genau beschrieben, nach der Methode Höflers (1930), vgl. Huber-Höfler (1930). Diese einfache und bequeme Berechnungsart ermöglicht eine große Anzahl von Zellen in kurzer Zeit zu messen und dann die Eintritts- oder Rückgangskonstante rechnerisch zu ermitteln.

$$\begin{aligned} \text{„Eintrittskonstante“: } k_E &= \frac{1}{C(t_2 - t_1)} \left\{ (g_1 - g_2) + G \cdot \ln \frac{g_1 - G}{g_2 - G} \right\} \\ \text{„Rückgangskonstante“: } k_R &= \frac{1}{C'(t_2 - t_1)} \left\{ -(g_2 - g_1) + G' \cdot \ln \frac{G' - g_1}{G' - g_2} \right\} \end{aligned}$$

Die notwendigen Plasmolysegrade  $g_1, g_2$ , gemessen zu den Zeiten  $t_1, t_2$ , werden aus dem Verhältnis des Protoplastenvolumens zum Zellvolumen nach der Formel

$$g = \frac{l - \frac{b}{3}}{h}$$

berechnet<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Zeichenerklärung:

$l$  = Länge des Protoplasten.

$h$  = Innenlänge der Zelle.

$b$  = Innenbreite der Zelle.

$C$  = Konzentration des Diosmotikums bei der Plasmolyse.

$G$  = Plasmolysegrad nach Erreichen des osmotischen Gleichgewichtes.

$C', G'$  = Konzentration des Deplasmolytikums, Endgrad der Plasmolyse im Deplasmolytikum.

Die Messungen wurden mit Zellen der Wasserblätter von *Salvinia natans* und den Zellen der Innenepidermis von *Allium cepa* ausgeführt. Bei allen vergleichenden Versuchen (vorbehandelte Zellen und Kontrollzellen) wurde streng darauf geachtet, immer physiologisch gleichwertiges Zellmaterial zu verwenden. So wurden bei *Salvinia* innerhalb einer Versuchsgruppe Zellhaare aus der gleichen Blattzone einer Pflanze genommen, während bei *Allium* (vgl. Houska 1939) immer annähernd flächengleiche Schnitte von der mittleren Zone der dritten Schuppe (von außen gezählt) Anwendung fanden. Die Messung der vorbehandelten Zellen erfolgte unter einem durch Glassplitter gestützten Deckglas. Ein Übertragen der Wasserblatteile von *Salvinia* vom Objektträger ins Plasmolysefläschchen war während der Messungen aus rein technischen Gründen nicht durchführbar. Um aber Konzentrationsschwankungen des Plasmolytikums bei den oft bis zu einer Stunde dauernden Messungen zu verhindern, wurde nach der schon beschriebenen Durchsaugemethode (Seemann 1930 a, 152) verfahren. Die Vorbehandlung der Zellen von *Allium* erfolgte in den reinen hypotonischen Lösungen der untersuchten Agenzien. Die Messungen mit den langsam permeablen *Allium-cepa*-Zellen beanspruchten oft mehrere, in Einzelfällen bis zu 60 Stunden. Um hier einen dauernden Wechsel der Schnitte zwischen Objektträger und Plasmolysefläschchen und die dadurch leicht mögliche Schädigung der subtilen Epidermis zu vermeiden, wurde ein auch von Guilliermond angewandtes Verfahren benützt. Das Charakteristische an dieser Methode ist der Einschluß des Deckglases mit flüssigem Paraffin, nachdem dieses in der bei *Salvinia* geschilderten Art am Objektträger fixiert wurde. Die Schnitte lagen frei im umgebenden Plasmolytikum und waren durch das Paraffin gegen Vertrocknen geschützt. Die Sauerstoffzufuhr wird dabei nicht unterbunden, und es ist mir mit dem gleichen Einschlußmittel ohne weiteres gelungen, *Spirogyra* sp. durch Monate unter dem Deckglas zu kultivieren. Die Innenepidermiszellen von *Allium cepa* hielten, nach dieser Methode eingeschlossen, die Plasmaströmung (im plasmolysierten Zustand) bis zu 48 Stunden aufrecht und lebten noch nach 5 bis 6 Tagen. Die Vorbereitungsarbeiten nahmen etwa 5 bis 6 Minuten in Anspruch, was aber bei *Allium* ohne Bedeutung war, da die Abhebung des Protoplasten spät erfolgte (erste Messung etwa ab achter Minute). Zur Überprüfung der Ergebnisse wurde ein Parallelversuch — Übertragen des Schnittes nach der Messung in das Plasmolysefläschchen — mit der alten Methode durchgeführt, der die gleichen Resultate erbrachte.

Die hypotonischen Salz- und Nichtleiterlösungen sowie die entsprechenden Plasmolytika und Deplasmolytika wurden stets mit bidestilliertem Wasser hergestellt. Die verwendeten Agenzien waren chemisch reine Produkte von Merck, Darmstadt (Kaliumnitrat, Kalziumchlorid, Strontiumchlorid und Magnesiumsulfat), und aus den Heilmittelwerken Wien (Harnstoff und Traubenzucker).

### I. Versuche mit *Salvinia natans*

Ein besonders geeignetes Objekt bildeten die Zellen der Wasserblätter von *Salvinia natans*. Von großem Vorteil war die ungehinderte Zutrittsmöglichkeit der Lösungen an jede einzelne Zelle sowie die Unempfindlichkeit gegen langes Wässern. Die Zellform eignet sich, mit Ausnahme der basalen und der letzten zwei distalen Zellen, ausgezeichnet für plasmometrische Messungen.

In den zunächst beschriebenen Versuchen wurden die Zellen in einer Traubenzuckerlösung plasmolysiert, die das zu untersuchende chemische

Agens in hypotonischer Konzentration gelöst enthält. Durch stufenweises Einlegen der Zellen in anfangs schwache Lösungen bis zur endgültigen Konzentration des Plasmolytikums wurde der schädigende Einfluß der Plasmolyse stark vermindert. Die Messung erfolgte bei der Deplasmolyse in reiner Traubenzuckerlösung. Bei den Kontrollversuchen war das Plasmolytikum salzfrei und mit der Mischlösung isoton. Die Wiederausdehnung der Protoplaste wurde unter dem Deckglas beobachtet und dabei dauernd frische Lösung zugesetzt und durchgesaugt.

#### A. Die Wirkung hypotonischer Salzlösungen auf die Wasserpermeabilität des Protoplasmas

##### 1. Versuche mit Kaliumnitrat

Die physiologischen Eigenschaften dieses Alkalisalzes sind aus der Literatur (z. B. Höfler 1928, 1934; Haan 1934; Kaho 1937; Houska 1939; Kreuz 1941 u. a.) hinreichend bekannt. In den folgenden Versuchen wurde mit Traubenzucker-Mischlösungen von 0,06 und 0,10 GM  $\text{KNO}_3$  gearbeitet.

Versuch II./84      14. XII. 1948       $T$  (Luft):  $19^\circ\text{C}$

Das Wasserblatt lag  $2\frac{1}{2}$  Stunden in der Salz-Traubenzucker-Mischlösung, bestehend aus  $0,6\text{ cm}^3$  1,0 GM  $\text{KNO}_3$ ;  $3,8\text{ cm}^3$  1,0 GM Dextrose,  $5,6\text{ cm}^3$  bidest. Wasser. Deplasmolyse in 0,30 GM Dextrose.

Zelle	$h$	$l_1$	$l_2$	$l$	$b$	$g'_1$	$g'_2$	$G'$	$k_R$	Zeit
4	39	28,5	30	34	19	0,56 <sub>9</sub>	0,60 <sub>7</sub>	0,71	0,30 <sub>8</sub>	4–6'
5	36	25,3	27	30,9	18	0,53 <sub>6</sub>	0,58 <sub>3</sub>	0,69 <sub>2</sub>	0,33 <sub>5</sub>	4–6'
6	40	26	28	32	16	0,51 <sub>7</sub>	0,56 <sub>8</sub>	0,66 <sub>6</sub>	0,37 <sub>5</sub>	4–6'
1'	60	38	40,5	47	23,5	0,50 <sub>3</sub>	0,54 <sub>5</sub>	0,65 <sub>4</sub>	0,34 <sub>7</sub>	4–6'

Mittelwert von  $k_R = 0,34$

Nach sechsstündigem Aufenthalte in der 0,06 GM  $\text{KNO}_3$  enthaltenden Traubenzuckermischlösung sinken die Werte von  $k_R$  bereits fühlbar ab und ergeben einen Mittelwert von  $k_R = 0,25_9$ . In fast der gleichen Höhe lagen die Mittelwerte des Kontrollversuches ( $k_R = 0,22_2$ ). Bei den Versuchen mit 0,10 GM  $\text{KNO}_3$ -haltigen Traubenzuckermischlösungen war ebenso nach längerer Wirkungszeit ein Absinken der Rückgangsgeschwindigkeit zu beobachten. Nach zweistündigem Aufenthalte erreichen die Mittelwerte von  $k_R$  die beachtliche Höhe von 0,47 und sinken bei  $5\frac{1}{2}$ stündiger Dauer auf 0,33<sub>8</sub> zurück.

In beiden untersuchten Konzentrationen von Kaliumnitrat (0,06 und 0,10 GM) tritt nach kurzer Wirkungszeit eine Erhöhung der Rückgangsgeschwindigkeit ein. Der Grad der Erhöhung steigt mit der Konzentrationshöhe der Salzlösung. Längerer Aufenthalt in den Mischlösungen läßt die Werte von  $k_R$  wieder stark absinken, bei 0,06 GM  $\text{KNO}_3$  stärker als bei 0,10 GM.

##### 2. Versuche mit Kalziumchlorid

Die Versuche mit Salzen zweiwertiger Kationen erstreckte sich auf solche aus der Gruppe der Erdalkalien ( $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{BaCl}_2$ ,  $\text{SrCl}_2$  und  $\text{MgSO}_4$ ). Die Versuchsbedingungen wechselten in der Höhe der hypotonischen Konzen-



trationen und der Aufenthaltsdauer in den salzhaltigen Traubenzucker-mischlösungen. Gemessen wurde die Rückdehnung der Protoplaste während der Deplasmolyse, die mit Ausnahme von einigen Versuchen immer in reiner Traubenzuckerlösung stattfand. Der osmotische Koeffizient der hypotonischen Salzlösungen wurde für jedes Salz genau bestimmt, um die Zellen der Kontrollversuche in garantiert isotonischen Traubenzuckerlösungen zu plasmolisieren. Lösungsmittel war bei allen Versuchen (über Jenaglas) bidest. Wasser.

Untersucht wurde die Wirkung des Kalziumchlorids in Traubenzucker-mischlösungen mit 0,04, 0,07 und 0,08 GM  $\text{CaCl}_2$ -Gehalt.

#### a) Versuche mit 0,04 GM $\text{CaCl}_2$

Der Verlauf der Plasmolyse und nachfolgenden Deplasmolyse läßt keine Schädigung irgendwelcher Art erkennen, und fast alle Zellen der behandelten Wasserblätter leben am Schluß der Messungen.

Versuch II./83 14. XII. 1948  $T: 19^\circ \text{C}$

35 Minuten im Plasmolytikum, Deplasmolyse in 0,3 GM Dextrose.

Zelle	$h$	$l_1$	$l_2$	$l$	$b$	$g'_1$	$g'_2$	$G'$	$k_R$	Zeit
2"	44	31,5	33,5	37	18,6	0,57 <sub>5</sub>	0,62	0,70	0,44 <sub>7</sub>	4—6'
3	40	29,5	31	34	19	0,57 <sub>5</sub>	0,61 <sub>3</sub>	0,69 <sub>3</sub>	0,43 <sub>7</sub>	4—6'
4	46	30	32	36,3	18	0,52 <sub>2</sub>	0,56 <sub>5</sub>	0,65 <sub>6</sub>	0,35 <sub>2</sub>	4—6'
5	41	27	29	32	15	0,53 <sub>6</sub>	0,58 <sub>5</sub>	0,65 <sub>9</sub>	0,47 <sub>6</sub>	4—6'

Mittelwert von  $k_R = 0,42_3$

Versuch II./87 14. XII. 1948  $T: 18,5^\circ \text{C}$

5½ Stunden im Plasmolytikum, Deplasmolyse in 0,3 GM Dextrose.

Zelle	$h$	$l_1$	$l_2$	$l$	$b$	$g'_1$	$g'_2$	$G'$	$k_R$	Zeit
2	57	35	36,7	47	18	0,50 <sub>7</sub>	0,54 <sub>1</sub>	0,72 <sub>1</sub>	0,15 <sub>2</sub>	4—6'
3	62	37,8	40	51	17	0,51 <sub>3</sub>	0,55 <sub>4</sub>	0,73 <sub>1</sub>	0,16 <sub>7</sub>	4—6'
4	54	33	35	45	18	0,50	0,53 <sub>7</sub>	0,74 <sub>1</sub>	0,14 <sub>3</sub>	4—6'
2"	65	39	41,5	52	18,6	0,50 <sub>3</sub>	0,54 <sub>4</sub>	0,70 <sub>5</sub>	0,19	4—6'

Mittelwert von  $k_R = 0,16_3$

Kontrollversuch II./86 14. XII. 1948  $T: 19^\circ \text{C}$

Plasmolyse in 0,5 GM Dextrose, Deplasmolyse in 0,3 GM Dextrose. Das Wasserblatt lag 1 Stunde 35 Minuten im Plasmolytikum.

Zelle	$h$	$l_1$	$l_2$	$l$	$b$	$g'_1$	$g'_2$	$G'$	$k_R$	Zeit
2	67	41	44	51,5	22	0,50 <sub>3</sub>	0,54 <sub>3</sub>	0,66	0,19 <sub>7</sub>	3—6'
4	58	36	39	45,7	19	0,51 <sub>2</sub>	0,56 <sub>4</sub>	0,67 <sub>9</sub>	0,22 <sub>4</sub>	3—6'
2"	57	35	38	44	18	0,50 <sub>7</sub>	0,56 <sub>1</sub>	0,66 <sub>7</sub>	0,24 <sub>5</sub>	3—6'

Mittelwert von  $k_R = 0,22_2$

Die relativ niedere Konzentration von 0,04 GM  $\text{CaCl}_2$  erhöht nach kurzer Wirkungszeit — ½ bis 1 Stunde — die Wasserpermeabilität, nach mehrstündiger Wirkungszeit liegen die Werte von  $k_R$  unter denen des Kontrollversuches und die Wasserpermeabilität

erscheint damit gehemmt (vgl. Abb. 1). Ähnlich, wenn auch in den Auswirkungen nicht so deutlich, sind die Ergebnisse bei Zellen, die in 0,04 GM  $\text{CaCl}_2$  vorbehandelt wurden und in einer salzhaltigen Mischlösung (0,02 GM  $\text{CaCl}_2$  deplasmolysierten).

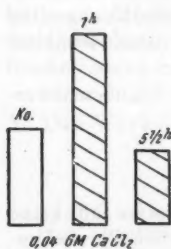


Abb. 1. *Salvinia natans*. Mittelwerte von  $k_R$  nach Vorbehandlung mit 0,04 GM  $\text{CaCl}_2$ . Deplasmolyse in 0,30 GM Dextrose.

Wirkungszeit:  
1 Stunde 25 Min.  
Mittelwert von  $k_R = 0,37_4$

Wirkungszeit:  
5 Stunden  
Mittelwert von  $k_R = 0,30_3$

Kontrolle:  
—  
Mittelwert von  $k_R = 0,22_3$

Bei salzhaltigen Deplasmolytika verflacht gleichsam die Wirkung, und der anfangs gut erkennbaren Erhöhung folgt nach 5stündiger Dauer ein schwacher Rückgang der Wasserpermeabilität.

#### b) Versuche mit 0,07 und 0,08 GM $\text{CaCl}_2$

Die Zellen ertrugen die Vorbehandlung in den beiden Konzentrationen in den meisten Fällen sehr gut, wenn auch oft einzelne Zellhaare schon während der Plasmolyse ganz ausfielen.

Versuch II./97 16. XII. 1948  $T: 20,5^\circ \text{C}$

50 Minuten im Plasmolytikum (0,7 GM  $\text{CaCl}_2$ ), Deplasmolyse in 0,30 GM Dextrose.

Zelle	$h$	$l_1$	$l_2$	$l$	$b$	$g'_1$	$g'_2$	$G'$	$k_R$	Zeit
2	40	26,5	28	32,5	17	0,51 <sub>8</sub>	0,55 <sub>7</sub>	0,67	0,26 <sub>7</sub>	4—6'
3	35	23,8	25,3	29	17	0,51 <sub>7</sub>	0,55 <sub>7</sub>	0,66 <sub>6</sub>	0,28 <sub>2</sub>	4—6'
4	28,5	19	20,3	23,5	14	0,50 <sub>2</sub>	0,54 <sub>4</sub>	0,65 <sub>9</sub>	0,26 <sub>4</sub>	2—4'
6	34	20	21,8	25,5	10	0,48 <sub>6</sub>	0,53 <sub>8</sub>	0,65	0,31 <sub>3</sub>	2—4'

Mittelwert von  $k_R = 0,27_8$

Der dazugehörige Kontrollversuch II./100, 16. XII. 1948, ergibt einen Mittelwert von  $k_R = 0,20_4$ . Die verhältnismäßig kurze Wirkungszeit von 50 Minuten genügt schon, um eine außerhalb der Fehlergrenzen liegende Erhöhung erkennen zu lassen.

Eine wenige Tage zuvor durchgeführte Versuchsreihe zeigt, daß die Erhöhung der Wasserpermeabilität — ausgedrückt in den Werten für  $k_R$  — oft das Dreibis Vierfache des Kontrollversuches betragen kann.

Versuch II./75 15. XII. 1948  $T: 18^\circ \text{C}$

1 Stunde 32 Minuten im Plasmolytikum (0,07 GM  $\text{CaCl}_2$ ), Deplasmolyse in 0,28 GM Dextrose.

Zelle	$h$	$l_1$	$l_2$	$l$	$b$	$g'_1$	$g'_2$	$G'$	$k_R$	Zeit
3	49	28	31,8	39	17	0,45 <sub>5</sub>	0,53 <sub>3</sub>	0,68	0,25 <sub>1</sub>	5—8'
4	55	31,8	36,5	44,8	18	0,46 <sub>9</sub>	0,55 <sub>3</sub>	0,70 <sub>6</sub>	0,26 <sub>8</sub>	5—8'
2'	41,5	25	27,8	33	15	0,48	0,54 <sub>9</sub>	0,67 <sub>4</sub>	0,27	5—8'

Mittelwert von  $k_R = 0,26_3$

Versuch II./79 13. XII. 1948  $T: 20^{\circ}\text{C}$ 5 Stunden im Plasmolytikum (0,07 GM  $\text{CaCl}_2$ ), Deplasmolyse in 0,28-GM Dextrose.

Zelle	$h$	$l_1$	$l_2$	$l$	$b$	$g'_1$	$g'_2$	$G'$	$k_R$	Zeit
3	44	24,5	27,7	32,3	14	0,45 <sub>0</sub>	0,53 <sub>2</sub>	0,63 <sub>7</sub>	0,47	3—5'
2	58	36,5	40,7	46,3	16	0,54	0,61 <sub>1</sub>	0,70 <sub>8</sub>	0,38	5—8'
2''	33	19,5	21	24	13	0,46 <sub>4</sub>	0,50 <sub>6</sub>	0,59 <sub>7</sub>	0,33	3—5'

Mittelwert von  $k_R = 0,39_3$ Kontrollversuch II./74 13. XII. 1948  $T: 18^{\circ}\text{C}$ 

Plasmolyse in 0,50 GM Dextrose, Deplasmolyse in 0,28 GM Dextrose.

Zelle	$h$	$l_1$	$l_2$	$l$	$b$	$g'_1$	$g'_2$	$G'$	$k_R$	Zeit
2	50	31,4	32,5	42	18	0,50 <sub>8</sub>	0,53 <sub>2</sub>	0,72	0,07 <sub>6</sub>	5—8'
3	30	22	23	28,3	16	0,55 <sub>6</sub>	0,58 <sub>7</sub>	0,76 <sub>7</sub>	0,10 <sub>8</sub>	2—5'
4''	59	34	37,3	52	20	0,46 <sub>3</sub>	0,51 <sub>7</sub>	0,77	0,10 <sub>7</sub>	5—8'
5''	43	26,3	28,7	40	16	0,48 <sub>8</sub>	0,54 <sub>4</sub>	0,80 <sub>0</sub>	0,11 <sub>8</sub>	5—8'

Mittelwert von  $k_R = 0,10_2$ 

Bei der etwas höheren Konzentration von 0,08 GM  $\text{CaCl}_2$  nimmt die Erhöhung mit längerer Wirkungsdauer im gleichen Ausmaße wie in den oben angeführten Versuchen zu. — In einer weiteren Versuchsgruppe waren wieder beide Arbeitslösungen salzhaltig<sup>2</sup>. Dem Plasmolytikum war eine 0,5 GM Dextroselösung isotonisch, dem Deplasmolytikum entsprach eine solche von 0,30 GM. Die Kontrollversuche wurden in salzfreien, isotonen Dextroselösungen vorbehandelt und plasmolysiert. Die auffallend kleinen Werte von  $k_R$  der auszugsweise hier wiedergegebenen Versuche sind in erster Linie eine Folge der niederen Temperatur, die während der Messungen herrschte (vgl. Seemann (1950b)). Zellen, die nur 5 Minuten dem Einfluß von 0,08 GM  $\text{CaCl}_2$  ausgesetzt waren, zeigten starke Krampfplasmolyseformen, welche auch bei der nachfolgenden Deplasmolyse erst spät in konvexe Formen übergingen.

Versuch II./126 3. I. 1949  $T: 10,5^{\circ}\text{C}$ 

45 Minuten im Plasmolytikum.

 $k_R: 0,06$  0,06<sub>8</sub> 0,10<sub>1</sub> 0,06<sub>0</sub> Meßzeit: 5.—8. MinuteMittelwert von  $k_R = 0,07_4$ Versuch II./127 3. I. 1949  $T: 11,5^{\circ}\text{C}$ 

3 Stunden im Plasmolytikum.

 $k_R: 0,16$  0,13<sub>9</sub> 0,16 Meßzeit: 5.—8. MinuteMittelwert von  $k_R = 0,15$ 

<sup>2</sup> Plasmolytikum	Deplasmolytikum
0,8 cm <sup>3</sup> 1,0 GM $\text{CaCl}_2$	0,4 cm <sup>3</sup> 1,0 GM $\text{CaCl}_2$
2,6 cm <sup>3</sup> 1,0 GM Dextrose	1,8 cm <sup>3</sup> 1,0 GM Dextrose
6,6 cm <sup>3</sup> bid. Wasser	7,8 cm <sup>3</sup> bid. Wasser

Versuch II./129 3. I. 1949  $T: 11,5^{\circ}\text{C}$ 

5 Stunden 40 Minuten im Plasmolytikum.

 $k_R: 0,19_6$  $0,22_8$  $0,20$ 

Meßzeit: 5.—8. Minute

Mittelwert von  $k_R = 0,20_8$ Kontrollversuch II./128 3. I. 1949  $T: 11^{\circ}\text{C}$ 

Plasmolyse in 0,5 GM Dextrose, Deplasmolyse in 0,3 GM Dextrose.

 $k_R: 0,14_1$  $0,07_6$  $0,11_1$ 

Meßzeit: 5.—8. Minute

Mittelwert von  $k_R = 0,11_3$ 

Die Ergebnisse über den Einfluß von hypotonischen Kalziumchloridlösungen auf die Wasserpermeabilität des Protoplasmas bei Zellen von *Salvinia natans* lassen sich wie folgt zusammenfassen:

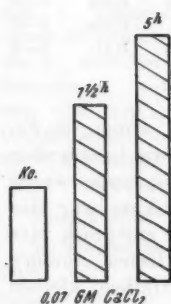


Abb. 2. *Salvinia natans*. Mittelwerte von  $k_R$  nach Vorbehandlung mit 0,07 GM  $\text{CaCl}_2$ . Deplasmolyse in 0,28 MG Dextrose.

1. Niedere Konzentrationen (0,4 GM  $\text{CaCl}_2$ ) erhöhen — eine gewisse Mindestwirkungszeit vorausgesetzt — die Wasserpermeabilität sofort. Diese Erhöhung geht aber nach mehrstündiger Wirkungszeit wieder zurück und die Salzwirkung kann schließlich in einer Hemmung der Wasserpermeabilität zum Ausdruck kommen.

2. Stärkere, an sich noch hypotonische Konzentrationen (0,07 und 0,08 GM  $\text{CaCl}_2$ ) erhöhen immer die Wasserpermeabilität, der Grad der Erhöhung steigt dann mit zunehmender Wirkungszeit (vgl. Abb. 2).

Die hier neuerlich beobachtete Abhängigkeit der Wirkung des Salzes von seiner Konzentration bestätigt die Feststellung de Haans (1933), daß niedere Konzentrationen von Salzen mit zweiwertigem Kation die Wasserpermeabilität vermindern, die gleichen Salze in stärkeren Konzentrationen sie aber erhöhen. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, daß neben der Konzentrationshöhe auch die Wirkungsdauer von entscheidendem Einfluß ist.

### 3. Versuche mit Strontiumchlorid

Die Arbeitsmethode ist die gleiche wie in den vorhergehenden Versuchen. Das Salz wurde in zwei Konzentrationen, 0,04 und 0,08 GM, untersucht. In der Traubenzuckermischlösung mit 0,04 GM  $\text{SrCl}_2$  konnten keine Messungen ausgeführt werden, da die Zellen entweder im Verlaufe der Deplasmolyse oder zumeist schon vorher abstarben. In der höheren Konzentration von 0,08 GM verliefen die Messungen ohne Zeichen einer Schädigung.

Versuch II./98 16. XII. 1948  $T: 21^{\circ}\text{C}$ 1 Stunde 40 Minuten im Plasmolytikum (0,08 GM  $\text{SrCl}_2$ ).

Deplasmolyse in 0,30 GM Dextrose.

Zelle	<i>h</i>	<i>l</i> <sub>1</sub>	<i>l</i> <sub>2</sub>	<i>l</i>	<i>b</i>	<i>g</i> ' <sub>1</sub>	<i>g</i> ' <sub>2</sub>	<i>G</i> '	<i>k<sub>R</sub></i>	Zeit
2	43	29	31	37	17	0,54 <sub>2</sub>	0,58 <sub>8</sub>	0,72 <sub>6</sub>	0,30 <sub>7</sub>	2—4'
3	38	26,3	28	33,5	15,5	0,55 <sub>5</sub>	0,60	0,73	0,27	2—4'
3''	38	26	27,8	33	19	0,51 <sub>8</sub>	0,57 <sub>4</sub>	0,70 <sub>2</sub>	0,33	2—4'

Mittelwert von  $k_R = 0,30_2$ Versuch II./101 16. XII. 1948  $T: 21^\circ \text{C}$ 6 Stunden 35 Minuten im Plasmolytikum (0,08 GM  $\text{SrCl}_2$ ).

Deplasmolyse in 0,30 GM Dextrose.

Zelle	<i>h</i>	<i>l</i> <sub>1</sub>	<i>l</i> <sub>2</sub>	<i>l</i>	<i>b</i>	<i>g</i> ' <sub>1</sub>	<i>g</i> ' <sub>2</sub>	<i>G</i> '	<i>k<sub>R</sub></i>	Zeit
3	46	28	30,5	34	14	0,50 <sub>9</sub>	0,55 <sub>9</sub>	0,63 <sub>7</sub>	0,45 <sub>3</sub>	4—6'
4	51	29,3	31,5	34,8	14	0,48	0,52 <sub>6</sub>	0,59	0,45 <sub>7</sub>	4—6'
6	29	18	20	23,3	12	0,48 <sub>3</sub>	0,55 <sub>2</sub>	0,66 <sub>2</sub>	0,42 <sub>2</sub>	2—4'

Mittelwert von  $k_R = 0,44_4$ Kontrollversuch II./100 16. XII. 1948  $T: 21^\circ \text{C}$ 

Plasmolyse in 0,5 GM Dextrose, Deplasmolyse in 0,30 GM Dextrose.

Zelle	<i>h</i>	<i>l</i> <sub>1</sub>	<i>l</i> <sub>2</sub>	<i>l</i>	<i>b</i>	<i>g</i> ' <sub>1</sub>	<i>g</i> ' <sub>2</sub>	<i>G</i> '	<i>k<sub>R</sub></i>	Zeit
3	50	30	32	40	17,8	0,48 <sub>2</sub>	0,52 <sub>4</sub>	0,68 <sub>2</sub>	0,19 <sub>7</sub>	4—6
4	63	38	40,7	51	18	0,50 <sub>8</sub>	0,55 <sub>1</sub>	0,71 <sub>5</sub>	0,20 <sub>5</sub>	2—4'
5	58	37,5	40	48	17	0,54 <sub>6</sub>	0,58 <sub>3</sub>	0,73	0,21	2—4'

Mittelwert von  $k_R = 0,20_4$ 

Der Einfluß von Strontiumchlorid (0,08 GM) kann als identisch mit der gleich hohen Konzentration von Kalziumchlorid bezeichnet werden (siehe Abb. 2 u. 3). Vergleichsmöglichkeiten mit der niederen Konzentration mußten leider infolge Schädigung der behandelten Zellen entfallen. Gleichartige Versuche mit Bariumchlorid 0,02; 0,04 und 0,08 GM konnten aus demselben Grunde nicht durchgeführt werden, da fast alle Zellen von *Salvinia* schon bei der Vorbehandlung zugrunde gingen.

#### 4. Versuche mit Magnesiumsulfat

Magnesium nimmt nach Höber (1926) in seinen physiologischen Eigenschaften eine Grenzstellung zwischen Alkalien und Erdalkalien ein. Zudem weicht es in seiner Wirkung als Plasmolytikum stark von den übrigen Erdalkalien ab. So scheint eine Lösung von Magnesiumsulfat eine osmotische Wirkung auszuüben, die nur annähernd so groß ist, wie es einem Nichtleiter entspricht; trotzdem leitet  $\text{MgSO}_4$  den elektrischen Strom gut. Einige in dieser Richtung unternommene Plasmolyseversuche mit *Salvinia* verliefen ergebnislos, da es selbst in hohen Konzentrationen zu keiner Abhebung der Protoplaste kam, die gleichen Zellen plasmolysierten später in Dextrose ganz normal.

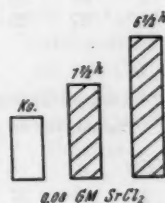


Abb. 3. *Salvinia natans*. Mittelwerte von  $k_R$  nach Vorbehandlung mit 0,08 GM  $\text{SrCl}_2$ . Deplasmolyse in 0,30 GM Dextrose.

Die Wirkung des Salzes auf die Wasserpermeabilität wurde in Traubenzuckermischlösungen, denen 0,04 und 0,08 GM des Magnesiumsulfates zugesetzt waren, untersucht. Schädigung war bei einem Teil der Zellen zu beobachten. Charakteristisch für die Vorbehandlung in  $MgSO_4$  ist eine Quellung des Plasmas, ähnlich wie bei Kappenplasma nach Kaliumbehandlung. Die im normalen Zustande runden Chloroplasten erscheinen dann in diesen Kappen eckig verändert. Daneben waren noch Plasmaverlagerungen (Netzbildung und Plasmalamellen) zu beobachten, die auch bei der Deplasmolyse erhalten blieben.

Versuche mit 0,04 GM  $MgSO_4$ Versuch II./136 5. I. 1949  $T: 16^\circ C$ 

2½ Stunden im Plasmolytikum, Deplasmolyse in 0,3 GM Dextrose.

Zelle	h	$l_1$	$l_2$	$l$	b	$g'_1$	$g'_2$	G'	$k_R$	Zeit
2	38	24	26	32	17	0,48 <sub>1</sub>	0,53 <sub>2</sub>	0,69 <sub>2</sub>	0,15 <sub>7</sub>	2—5'
3	32	21	22	26	16	0,49	0,52 <sub>2</sub>	0,64 <sub>6</sub>	0,13	5—8'
2''	31	22	23	26	19,5	0,49 <sub>7</sub>	0,53 <sub>2</sub>	0,63 <sub>2</sub>	0,17 <sub>2</sub>	5—8'
4''	35	20,8	21,7	25,3	16,3	0,44	0,46 <sub>8</sub>	0,56 <sub>6</sub>	0,12 <sub>8</sub>	5—8'

Mittelwert von  $k_R = 0,14_7$ Versuch II./139 5. I. 1949  $T: 16^\circ C$ 

3½ Stunden im Plasmolytikum, Deplasmolyse in 0,3 GM Dextrose.

Zelle	h	$l_1$	$l_2$	$l$	b	$g'_1$	$g'_2$	G'	$k_R$	Zeit
2	44	30	33	37	21	0,52 <sub>3</sub>	0,59 <sub>1</sub>	0,68 <sub>2</sub>	0,34 <sub>8</sub>	2—5'
5	35	25	27,5	31	20	0,52 <sub>3</sub>	0,59 <sub>6</sub>	0,69 <sub>4</sub>	0,34 <sub>2</sub>	5—8'

Mittelwert von  $k_R = 0,34_5$ Kontrollversuch II./138 5. I. 1949  $T: 16^\circ C$ 

Plasmolyse in 0,5 GM Dextrose, Deplasmolyse in 0,5 GM Dextrose.

Zelle	h	$l_1$	$l_2$	$l$	b	$g'_1$	$g'_2$	G'	$k_R$	Zeit
2	59	37	39	53,4	21	0,50 <sub>8</sub>	0,54 <sub>3</sub>	0,78 <sub>6</sub>	0,07 <sub>8</sub>	2—5'
3	56,5	36	37,8	51	21	0,51 <sub>4</sub>	0,54 <sub>5</sub>	0,77 <sub>9</sub>	0,07 <sub>3</sub>	2—5'
4	33	19	20,3	25,5	12,6	0,44 <sub>8</sub>	0,48 <sub>6</sub>	0,64 <sub>6</sub>	0,10 <sub>8</sub>	2—5'

Mittelwert von  $k_R = 0,08_6$ Versuche mit 0,08 GM  $MgSO_4$ Versuch II./140 5. I. 1949  $T: 15^\circ C$ 

35 Minuten im Plasmolytikum, Deplasmolyse in 0,3 GM Dextrose. Vereinzelt tritt Kappenbildung auf (Zelle 5), doch unterscheiden sich diese Zellen nicht von den übrigen in bezug auf die Rückgangsgeschwindigkeit.

Zelle	h	$l_1$	$l_2$	$l$	b	$g'_1$	$g'_2$	G'	$k_R$	Zeit
4	44	30,3	31	34	16	0,56 <sub>6</sub>	0,58 <sub>4</sub>	0,65 <sub>2</sub>	0,15	8—11'
5	34	23,3	24	27	12	0,56 <sub>5</sub>	0,58 <sub>8</sub>	0,67 <sub>6</sub>	0,14 <sub>6</sub>	8—11'
6	30	18	19	23,3	9	0,50	0,53 <sub>4</sub>	0,67 <sub>4</sub>	0,12 <sub>6</sub>	8—11'

Mittelwert von  $k_R = 0,14_1$



Versuch II./142 5. I. 1949 T: 15° C

3 Stunden im Plasmolytikum, Deplasmolyse in 0,3 GM Dextrose.

Zelle	h	$l_1$	$l_2$	$l$	b	$g'_1$	$g'_2$	$G'$	$k_R$	Zeit
3	25,5	22	23	24,7	16,8	0,64 <sub>3</sub>	0,68 <sub>3</sub>	0,74 <sub>9</sub>	0,35	5—8'
4	37	26	27,7	20,3	15,6	0,56 <sub>2</sub>	0,60 <sub>3</sub>	0,67 <sub>3</sub>	0,33	5—8'
6	48	34	36	39,3	14	0,61	0,65 <sub>2</sub>	0,71 <sub>9</sub>	0,34 <sub>2</sub>	5—8'
3''	40,5	31,3	33	35,2	15,3	0,64 <sub>7</sub>	0,68 <sub>9</sub>	0,74 <sub>3</sub>	0,38 <sub>7</sub>	5—8'

Mittelwert von  $k_R = 0,35_2$ 

Abb. 4. *Salvinia natans*. Mittelwerte von  $k_R$  nach Vorbehandlung mit 0,04 GM  $MgSO_4$ . Deplasmolyse in 0,30 GM Dextrose.

Die Rückgangsgeschwindigkeit der Plasmolyse und damit die Wasserpermeabilität des Protoplasmas wird durch hypotonische Konzentrationen von Magnesiumsulfat (0,04 und 0,08 GM) in allen Versuchen erhöht. Der Grad der Erhöhung nimmt in beiden untersuchten Konzentrationen des Salzes mit der Länge der Wirkungszeit zu (siehe Abb. 4 u. 5) und unterscheidet sich in dieser Beziehung vom Kalziumchlorid.

## B. Die Wirkung hypotonischer Nichtleiterlösungen

### 1. Vorbehandlung mit Harnstoff

Die Versuche mit hypotonischen Harnstofflösungen, dem physiologisch sehr gut bekannten Diosmotikum (vgl. Höfler und Weber 1926, Hof-

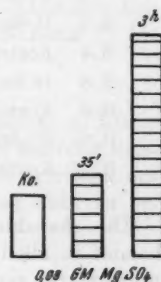


Abb. 5. *Salvinia natans*. Mittelwerte von  $k_R$  nach Vorbehandlung mit 0,08 GM  $MgSO_4$ . Deplasmolyse in 0,30 GM Dextrose.

meister 1935, Rottenburg 1943, Höfler 1949 u. a.), erfolgten auf breiter Grundlage. Die Untersuchungen wurden zum Teil in der alten Weise — Plasmolyse der Wasserblatteile in harnstoffhaltigen Traubenmischlösungen und folgende Messung während der Deplasmolyse in reiner Traubenzuckerlösung — durchgeführt. Da dieser Arbeitsmethode aber in zeitlicher Hinsicht doch gewisse Grenzen gesetzt sind, die bei den relativ schnell wirkenden Salzen kaum ins Gewicht fallen, mußte hier eine Änderung vorgenommen werden. Die Zellen von *Salvinia* wurden daher vor der Messung in reine, hypotonische Harnstofflösungen gelegt und damit vorbehandelt. Die nachfolgende Plasmolyse und gleichzeitige Messung fand in verschiedenen Plasmolytika, wie Traubenzucker, Sulfoharnstoff, Kaliumnitrat, Kaliumchlorid und Kalziumchlorid, statt. Bei langem Aufenthalte in den hypotonischen Harnstofflösungen (die Vorbehandlungszeiten erstreckten sich oft bis zu 24 Stunden) tritt natürlich Harnstoff in die Zellvakuole ein und die osmotischen Werte der Zellen sind dann erhöht. Im allgemeinen waren je-

doch die Veränderungen der osmotischen Werte, wie die Tabelle zeigt, nur von geringem Ausmaße und reichen daher nicht aus, die Meßergebnisse in ihrer Bewertung einzuschränken. Die Angaben für die osmotischen Werte ( $O = C \cdot G$ ) beziehen sich immer auf die in den Versuchen gemessenen Zellen und sind Mittelwerte.

Versuch	Vorbehandlung	Plasmolytikum	O
II./51	16 Stunden in 0,2 GM Harnstoff	0,35 GM KCl	0,14 KCl
II./52	17 Stunden in 0,2 GM Harnstoff	0,35 GM KCl	0,13 <sub>4</sub> KCl
II./53	18 Stunden in 0,1 GM Harnstoff	0,35 GM KCl	0,12 KCl
I'./55	Kontrollversuch	0,35 GM KCl	0,11 KCl
II./3	15 Stunden in 0,2 GM Harnstoff	0,25 GM KNO <sub>3</sub>	0,11 <sub>8</sub> KNO <sub>3</sub>
II./4	Kontrollversuch	0,25 GM KNO <sub>3</sub>	0,10 KNO <sub>3</sub>
II./6	19 Stunden in 0,2 GM Harnstoff	0,45 GM Sulfoharnstoff	0,25 Sulfoh.
II./8	Kontrollversuch	0,45 GM Sulfoharnstoff	0,21 Sulfoh.
II./85	3 1/2 Stunden in 0,12 GM Harnstoff	0,30 GM Traubenzucker	0,12 <sub>8</sub> Trz.
II./82	Kontrollversuch	0,30 GM Traubenzucker	0,12 Trz.

Die charakteristische Wirkung der hypotonischen Harnstofflösungen kommt in allen Untersuchungen in einer Hemmung der Wasserpermeabilität zum Ausdruck. Dieser Einfluß machte sich aber erst nach längerer Wirkungszeit — mindestens drei bis vier Stunden — bemerkbar, bei höheren hypotonischen Konzentrationen etwas früher, bei kleineren Konzentrationen aber später. Das Maximum der Wirkung des Harnstoffes kommt jedoch erst nach mehr als zehnstündiger Wirkungsdauer vollends zur Geltung. Die Wahl des Diosmotikums, worin nachher die Messung der Eintrittskonstante erfolgte, war in allen Versuchen ohne Bedeutung, indem die Vorbehandlung mit Harnstoff, wie schon gesagt, immer eine Hemmung der Wasserpermeabilität hervorrief. Die graduellen Unterschiede der Werte von  $k$ , welche sich bei Messungen ergeben, die in Salzlösungen bzw. Traubenzuckerlösungen stattfanden, sind im wesentlichen ein Resultat der verschieden hohen osmotischen Koeffizienten von Salzen und Nichtleitern.

#### a) Plasmolyse in Sulfoharnstoff (0,45 GM) .

Harnstoff selbst konnte bei der Ermittlung der Eintrittskonstanten als Plasmolytikum nicht verwendet werden, dagegen Sulfoharnstoff, der bei den *Salvinia*-Zellen ohne sichtbare Wirkung blieb. Da im Sommer des gleichen Jahres mit demselben Plasmolytikum zahlreiche Messungen gemacht wurden — aus diesen Sommersversuchen lagen z. B. die Mittelwerte von unbehandelten Zellen aus 44 Einzelmessungen ( $k_E = 0,37$ ) vor — konnten diese Ergebnisse für die weiteren Versuche als Vergleichsmaß Verwendung finden. Während im Herbst die Mittelwerte der Kontrollen aus 8 Messungen nur um wenig höher als im Sommer lagen ( $k_E = 0,37_8$ ), zeigten die in 0,2 GM Harnstoff vorbehandelten Zellen nach 19stündigen Aufenthalte wesentlich niedrigere Werte von  $k_E$  (0,24, 0,24<sub>8</sub>, 0,23, 0,22<sub>2</sub>).

## b) Plasmolyse in Kaliumchlorid (0,35 GM)

Deutlicher und schon bei der Messung fühlbar tritt hier die hemmende Wirkung des Harnstoffes in Erscheinung:

Versuch	Vorbehandlung	Mittelwert von $k_E$
II./53	18 Stunden in 0,10 GM Harnstoff	0,24 <sub>6</sub>
II./51	16 Stunden in 0,20 GM Harnstoff	0,16 <sub>7</sub>
II./52	17 Stunden in 0,20 GM Harnstoff	0,17 <sub>7</sub>
II./55	Kontrollversuch	0,53 <sub>7</sub>

Beim Plasmolyseeintritt waren die Protoplasten der vorbehandelten Zellen meist konkav, rundeten sich aber bis zu Beginn der Messung (7. bis 12. Minute).

## c) Plasmolyse in Kaliumnitrat (0,25 GM)

Durch schönen Plasmolyseverlauf zeichneten sich die Versuche in  $KNO_3$  aus, da die Protoplasten von Beginn der Abhebung an stets konvexe Rundung hatten. Eine Wiederausdehnung der Protoplaste nach Erreichen des osmotischen Gleichgewichtes war ebenso wie Kappenbildung nicht zu beobachten.

Versuch II./5 30. XI. 1948  $T: 20^\circ C$

Das Wasserblatt lag 15 Stunden in 0,20 GM Harnstoff.

Zelle	$h$	$l_1$	$l_2$	$l$	$b$	$g_1$	$g_2$	$G$	$k_E$	Zeit
2	44	39,7	35,3	26	15	0,79	0,68 <sub>7</sub>	0,47 <sub>7</sub>	0,29 <sub>4</sub>	7—11'
3	51	45	40,3	29	15	0,78 <sub>5</sub>	0,69	0,47	0,26 <sub>3</sub>	7—11'
4	44	36	32	25	13	0,72	0,62 <sub>5</sub>	0,47	0,31 <sub>9</sub>	7—11'
3''	44	41	37	29	19,5	0,78 <sub>4</sub>	0,69 <sub>3</sub>	0,51 <sub>1</sub>	0,29 <sub>8</sub>	7—11'

Mittelwert von  $k_E = 0,29_3$

Kontrollversuch II./4 30. XI. 1948  $T: 20^\circ C$

Das Wasserblatt lag 16 Stunden im Standortwasser.

Zelle	$h$	$l_1$	$l_2$	$l$	$b$	$g_1$	$g_2$	$G$	$k_E$	Zeit
3	57	36,5	31	27,5	17	0,54 <sub>1</sub>	0,44 <sub>4</sub>	0,38 <sub>1</sub>	0,45	6—10'
6	26	18	16	15	12	0,53 <sub>3</sub>	0,46 <sub>2</sub>	0,42 <sub>3</sub>	0,53 <sub>3</sub>	6—10'
3''	38	25	22	20	14	0,52 <sub>9</sub>	0,45 <sub>5</sub>	0,40 <sub>2</sub>	0,42 <sub>6</sub>	6—10'
2''	46	28,8	24	22,3	16	0,51 <sub>1</sub>	0,42 <sub>4</sub>	0,37	0,44 <sub>2</sub>	6—10'

Mittelwert von  $k_E = 0,46_2$

Die hemmende Wirkung des Harnstoffes ist auch bei der Plasmolyse in Kalziumchlorid (0,18 GM) sichtbar, und es erübrigt sich, die Versuche im einzelnen näher zu behandeln.

## 2. Vorbehandlung mit Traubenzucker

In einer eigenen Versuchsgruppe wurde der Einfluß von hypotonischen Traubenzuckerlösungen (0,10 und 0,20 GM) auf die Eintrittsgeschwindigkeit

bei nachfolgender Plasmolyse in Traubenzucker untersucht. Für die täglich frisch zubereiteten Arbeitslösungen wurde steriles Standortwasser genommen.

a) Versuche mit 0,10 GM Traubenzucker

Versuch II./227 18. III. 1949  $T: 21^{\circ}\text{C}$

Das Wasserblatt lag  $1\frac{1}{2}$  Stunden in 0,10 GM Traubenzucker. Plasmolyse in 0,50 GM Traubenzucker.

Zelle	$h$	$l_1$	$l_2$	$l$	$b$	$g_1$	$g_2$	$G$	$k_E$	Zeit
2	65	57	52	37	18	0,78 <sub>5</sub>	0,70 <sub>8</sub>	0,47 <sub>7</sub>	0,14 <sub>3</sub>	7—10'
4	54	44,5	40	27,5	17	0,71 <sub>9</sub>	0,63 <sub>6</sub>	0,40 <sub>4</sub>	0,15 <sub>8</sub>	4—7'
2"	57	48	45	37,5	20	0,72 <sub>5</sub>	0,67 <sub>2</sub>	0,54 <sub>1</sub>	0,15 <sub>7</sub>	7—10'

Mittelwert von  $k_E = 0,15_3$

Kontrollversuch II./228 18. III. 1949  $T: 21^{\circ}\text{C}$

Plasmolyse in 0,50 GM Traubenzucker.

Zelle	$h$	$l_1$	$l_2$	$l$	$b$	$g_1$	$g_2$	$G$	$k_E$	Zeit
3	51	37	34	31	16,5	0,61 <sub>8</sub>	0,55 <sub>9</sub>	0,50	0,27	8—11'
5	35	22	20	18	12,6	0,50 <sub>9</sub>	0,45 <sub>1</sub>	0,39 <sub>4</sub>	0,22 <sub>3</sub>	5—8'
2"	67	55	47,5	37,5	20	0,72 <sub>1</sub>	0,60 <sub>9</sub>	0,45 <sub>2</sub>	0,23 <sub>6</sub>	5—8'

Mittelwert von  $k_E = 0,24_3$

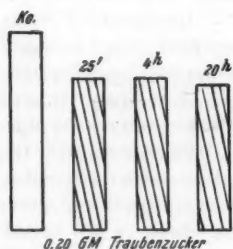


Abb. 6. *Salvinia natans*. Mittelwerte von  $k_E$  nach Vorbehandlung der Zellen mit 0,20 GM Traubenzucker. Plasmolyse in 0,50 GM Traubenzucker.

Die Vorbehandlung mit Traubenzucker wirkt hemmend auf die Wasserpermeabilität. Im Gegensatz zum Harnstoff wird diese hemmende Wirkung des Traubenzuckers schon nach relativ kurzer Einwirkungszeit (hier  $1\frac{1}{2}$  Stunden) nachweisbar.

b) Versuche mit 0,20 GM Traubenzucker

Der Hauptzweck dieser Versuche war, die Dauer der Wirkungszeit festzustellen. Die Wasserbehälter wurden daher nach einer Aufenthaltsdauer von 25 Minuten, 4 Stunden und 20 Stunden in der hypotonischen Traubenzuckerlösung plasmolysiert und gemessen (siehe Abb. 6).

Versuch II./226 18. III. 1949  $T: 20,5^{\circ}\text{C}$

Das Wasserblatt lag 25 Minuten in 0,20 GM Traubenzucker. Plasmolyse in 0,50 GM Traubenzucker.

Zelle	$h$	$l_1$	$l_2$	$l$	$b$	$g_1$	$g_2$	$G$	$k_E$	Zeit
2	56	44	40,5	32	21	0,66 <sub>1</sub>	0,59 <sub>9</sub>	0,44 <sub>6</sub>	0,14 <sub>3</sub>	10—13'
3	56	44	41	32,6	18	0,67 <sub>8</sub>	0,62 <sub>6</sub>	0,47 <sub>4</sub>	0,19 <sub>7</sub>	5—7'
2"	53	38,3	36	31,5	19	0,60 <sub>4</sub>	0,56 <sub>1</sub>	0,47 <sub>2</sub>	0,15 <sub>3</sub>	13—16'
3"	63	47	42,5	32,3	15	0,66 <sub>8</sub>	0,59 <sub>6</sub>	0,43 <sub>2</sub>	0,15 <sub>3</sub>	10—13'

Mittelwert von  $k_E = 0,16_1$

Versuch II./229 18. III. 1949  $T: 21^{\circ}\text{C}$ 

Das Wasserblatt lag 4 Stunden in 0,20 GM Traubenzucker. Plasmolyse in 0,50 GM Traubenzucker.

Zelle	$h$	$l_1$	$l_2$	$l$	$b$	$g'_1$	$g'_2$	$G'$	$k_E$	Zeit
2	72	56	52	53	25	0,66 <sub>8</sub>	0,60 <sub>7</sub>	0,48 <sub>2</sub>	0,15 <sub>6</sub>	11–14'
3	93	70,5	63	47	23	0,67 <sub>6</sub>	0,59 <sub>5</sub>	0,42 <sub>3</sub>	0,16 <sub>3</sub>	11–14'
4	89	76	67	47	20	0,77 <sub>9</sub>	0,67 <sub>8</sub>	0,45 <sub>3</sub>	0,17 <sub>9</sub>	11–14'

Mittelwert von  $k_E = 0,16_6$ Versuch II./232 19. II. 1949  $T: 18^{\circ}\text{C}$ 

Das Wasserblatt lag 20 Stunden in 0,20 GM Traubenzucker. Plasmolyse in 0,50 GM Traubenzucker.

 $k_E: 0,13_5$      $0,15_9$      $0,16_3$     Meßzeit: 10–13 MinutenMittelwert von  $k_E = 0,15_2$ Kontrollversuch II./230 18. III. 1949  $T: 20,5^{\circ}\text{C}$ 

Plasmolyse in 0,50 GM Traubenzucker.

 $k_E: 0,23_6$      $0,22_4$      $0,19_7$     Meßzeit: 8–11 MinutenMittelwert von  $k_E = 0,21_9$ 

Die Hemmung der Wasserpermeabilität zeigt in allen Versuchen die gleiche Höhe, unabhängig von der Dauer der Wirkungszeit. Hypotonische Lösungen von Traubenzucker setzen die Eintrittsgeschwindigkeit der Plasmolyse herab. Die Konzentrationshöhe der Lösungen und die Wirkungszeit scheinen dabei keinen weiteren Einfluß auf die vielleicht spontan einsetzende Hemmung auszuüben.

### C. Besprechung der Versuchsergebnisse mit *Salvinia natans*

Neben den Salzen aus der Alkali- und Erdalkalireihe, die immer in Mischlösungen mit dem Plasmolytikum (Traubenzucker) geboten wurden, umfaßt die mitgeteilte Versuchsreihe auch Untersuchungen über den Einfluß von hypotonischen Nichtleiterlösungen auf die Wasserpermeabilität des Protoplasmas. In allen Fällen konnte eine meßbare Beeinflussung der Wasserpermeation beobachtet werden, die entweder in einer Erhöhung oder Hemmung zum Ausdruck kommt. Die Art des Einflusses hängt in erster Linie vom Chemismus des untersuchten Agens (Salz oder Nichtleiter) ab, zweitens von der Konzentrationshöhe, in der das Agens wirkte, und drittens, wenn auch nicht so auffällig, von der Wirkungszeit. Letztere ist zugleich mit der Konzentrationshöhe bestimmend für die Stärke der Wirkung. Die Ergebnisse der Versuchsreihe lassen sich wie folgt kurz zusammenfassen:

**Kaliumnitrat:** Untersucht in zwei hypotonischen Konzentrationen von 0,06 und 0,10 GM. Nach kurzer Wirkungszeit ergibt sich jedesmal eine starke Erhöhung, die bei längerer Wirkungszeit zurückgeht und dann die Werte der Kontrollversuche erreichen kann.

**Kalziumchlorid:** In Übereinstimmung mit den Ergebnissen de Haans (1935) wird in den stärkeren Konzentrationen (0,07 und 0,08 GM die Wasserpermeabilität erhöht. Die schon nach kurzer Vorbehandlung bestehende Erhöhung baut sich bei längerer Wirkungszeit noch weiter aus. Abweichend davon ist der Einfluß der Wirkungszeit bei schwächerer Konzentration (0,04 GM). Hier wurde nach kurzer Dauer der Vorbehandlung die Wasserpermeabilität des Protoplasmas stark erhöht. Erst nach längerer Wirkungszeit (mehrere Stunden) kam es zu der von de Haan (1935) beschriebenen Hemmung.

**Strontiumchlorid:** Messungen in Lösungen mit 0,08 GM des Salzes lassen eine deutliche Erhöhung der Wasserpermeabilität erkennen.

**Magnesiumsulfat:** In beiden untersuchten Konzentrationen (0,04 und 0,08 GM) tritt Erhöhung ein.

Die primäre Wirkung der hier untersuchten Salze auf die Wasserpermeabilität des Protoplasmas kann daher ganz allgemein als erhöhend bezeichnet werden. Abweichungen von dieser Richtung sind durch Umstände, wie sie sich aus der Konzentrationshöhe und der Wirkungszeit ergeben, bedingt.

Die untersuchten Nichtleiter (**Harnstoff** und **Traubenzucker**) hemmen immer die Wasserpermeabilität. Trotzdem besteht in der Art, wie diese Wirkung zustande kommt, zwischen Harnstoff und Traubenzucker ein wesentlicher Unterschied. So ist bei Harnstoff die Mindestwirkungszeit sechs- bis zehnmal länger als bei den Salzen, der endgültige, nicht mehr steigerungsfähige Hemmungsgrad wird durchschnittlich erst nach 15- bis 20stündiger Wirkungszeit erreicht. Ganz anders ist der Einfluß des Traubenzuckers. Die Mindestwirkungszeit scheint genau so kurz wie bei den Salzen zu sein, und der anfangs gemessene Hemmungsgrad erfährt keine weitere Steigerung, gleichgültig, ob die Messung nach 25 Minuten, 4 oder 20 Stunden dauernder Wirkungszeit (Vorbehandlung) erfolgte.

Da die aus den Versuchsergebnissen mit *Salvinia* entspringenden Probleme eine weitere Behandlung der gleichen Frage wünschenswert machten, wurden im Frühjahr 1951 analoge Versuche mit den Innenepidermis-Zellen von *Allium cepa* durchgeführt. Zur Wahl dieser zu physiologischen Versuchen oft verwendeten Zellen wurde ich in erster Linie durch die Arbeiten von de Haan (1933, 1935) und Levitt, Scarth und Gibbs (1936) veranlaßt, die an dem gleichen Objekte die Wasserpermeabilität untersucht haben.

## II. Versuche mit *Allium cepa*

Verwendet wurden ungetriebene, gesunde Zwiebeln der auf dem Wiener Markt erhältlichen Sorte „Gelbe Wiener Riesen“. Mit Rücksicht auf das Zellenmaterial mußte die Arbeitsmethode in der oben bereits beschriebenen Weise geändert werden. Ein weiterer Unterschied betrifft die Vorbehandlung der Zellen, die in dieser Versuchsreihe immer in reinen hypotonischen Lösungen erfolgte.



## A. Die Wirkung hypotonischer Salzlösungen auf die Wasserpermeabilität des Protoplasmas

### 1. Versuche mit Kaliumnitrat

Die Vorbehandlung der Schnitte erfolgte in drei hypotonischen Konzentrationen (0,01, 0,04 und 0,08 GM) bei Wirkungszeiten von 6 bis 60 Stunden. Allzu langer Aufenthalt in den hypotonischen Lösungen (60 Stunden) schädigte bereits die Zellen, bei zu kurzer Dauer (unter 4 Stunden) war keine Wirkung zu beobachten. Neu bei diesen Versuchen war die Tatsache, daß, abgesehen von innerhalb der Fehlergrenze liegenden Wertunterschieden, keine meßbaren Veränderungen der Wasserpermeabilität festgestellt werden konnten, wenn die in  $\text{KNO}_3$  vorbehandelten Zellen wieder in Kaliumnitrat plasmolysiert wurden. Gut meßbar war jedoch der Einfluß der hypotonischen Lösungen bei folgender Plasmolyse in Kalziumchlorid (10,30 GM), wo in allen Konzentrationen (Wirkungszeiten von 6 bis 12 Stunden) die Wasserpermeabilität gehemmt erscheint. Das gleiche gilt für die Versuche, die in Traubenzuckerlösung (0,85 GM) plasmolysiert wurden, nur war dann der Hemmungsgrad wertmäßig kleiner. Zu einer Erhöhung nach kurzer Wirkungszeit wie bei *Salvinia* kam es in keinem Falle; vielmehr konnte ein Einfluß von hypotonischen Kaliumnitratlösungen bei *Allium* erst nach längerer Wirkungszeit meßbar festgestellt werden.

### 2. Versuche mit Kalziumchlorid

Vorbehandelt wurden die Schnitte in drei hypotonischen Konzentrationen (0,01, 0,04 und 0,08 GM). Der Einfluß dieses Salzes macht sich ebenfalls erst nach längerer Wirkungszeit bemerkbar. Schnitte, die 9 Stunden in 0,08 GM  $\text{CaCl}_2$  lagen, zeigten nur geringe Erhöhung der Eintrittsgeschwindigkeit gegenüber den Kontrollversuchen. Dauerte aber, wie in einem extremen Falle, die Wirkungszeit 48 Stunden, so stiegen die Werte von  $k_g$  um das Dreifache im Vergleich zu den Kontrollen. Die Mehrzahl der Schnitte wurde in  $\text{CaCl}_2$  (0,30 GM) plasmolysiert. Die damit vorbehandelten und dann plasmolysierten Zellen zeichneten sich gegenüber allen anderen hier untersuchten durch lange Lebensdauer (bis zu 10 Tagen) und Beibehalten der Plasmaströmung aus. Kalziumchlorid war somit hier bei *Allium* das unschädlichste Plasmolytikum. Die in 0,04 GM  $\text{CaCl}_2$  vorbehandelten Zellen ließen nur eine starke Hemmung der Wasserpermeabilität erkennen. Beweise für die nach kurzer Wirkungszeit auftretende Erhöhung wie bei *Salvinia* fehlen hier. Die bei 0,04 GM beobachtete Hemmung nimmt mit zunehmender Wirkungszeit noch an Ausmaß zu, doch ist dem bald ein Ziel gesetzt, da nach zu langer Dauer das Plasma „verhärtet“ erschien und die Protoplasten starke und stundenlang andauernde Krampfformen hatten. Nur die Zellen des Wundrandes zeigten dann konvexe Formen. Analoge Verhältnisse herrschen bei der Konzentration von 0,01 GM, auch hier kommt es zu einer Hemmung. Bei folgender Plasmolyse in Traubenzucker (0,85 GM) ist der Einfluß des Salzes schwach zu erkennen, prinzipiell aber von der gleichen Art, wie oben geschildert.

Zusammenfassend ergibt sich bei 0,08 GM  $\text{CaCl}_2$  eine Erhöhung, während schwächere Konzentrationen (0,01 und 0,04 GM) des gleichen Salzes die Wasserpermeabilität hemmen (vgl. de Haan 1935).

## B. Die Wirkung hypotonischer Nichtleiterlösungen auf die Wasserpermeabilität des Protoplasmas

### 1. Versuche mit Harnstoff

Von den drei untersuchten Konzentrationen 0,01; 0,04 und 0,08 GM blieb die erste wirkungslos und erwies sich als zu schwach. Im Gegensatz zu *Salvinia* wurde bei den Innenepidermiszellen von *Allium cepa* selbst nach einem 60stündigen Aufenthalte in 0,08 GM Harnstoff keine Erhöhung des osmotischen Wertes der Zellen gemessen<sup>3</sup>. Dieser lange Aufenthalt in der hypotonischen Harnstofflösung verlief für die so behandelten Zellen ohne Zeichen einer Schädigung.

Einige Messungen, bei welchen in Kalziumchlorid plasmolysiert wurde, zeigen wieder schön die hemmende Wirkung des Harnstoffes.

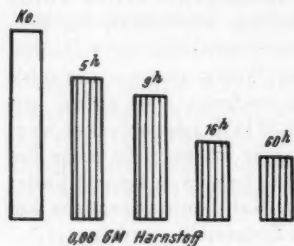


Abb. 7. *Allium cepa*. Mittelwerte von  $k_F$  nach Vorbehandlung der Zellen mit 0,08 Harnstoff. Plasmolyse in 0,30 GM  $\text{CaCl}_2$ .

Versuch 22 11. III. 1951 T: 16° C.

Der Schnitt lag 16 Stunden in 0,08 GM Harnstoff. Plasmolyse in 0,3 GM  $\text{CaCl}_2$ . Anfangs vorhandene Plasmaquellung geht nach 20 bis 30 Minuten wieder zurück. Messungen in der 14. und 18. Minute. Letzte Beobachtung 8 Stunden nach Beginn des Versuches: Alle Zellen im Schnitt leben, das Plasma strömt noch. Mittelwert von  $G$  (7 Zellen) = 0,56<sub>8</sub>.

$k_F$ : 0,06<sub>2</sub>, 0,03<sub>8</sub>, 0,03<sub>7</sub>, 0,03<sub>9</sub>, 0,06<sub>7</sub>, 0,03<sub>9</sub>. Mw = 0,04<sub>5</sub>.

Versuch 23 11. III. 1951 T: 16° C

Der Schnitt lag 16 Stunden in 0,04 GM Harnstoff. Plasmolyse in 0,3 GM  $\text{CaCl}_2$ . Messungen in der 24. und 32. Minute. Letzte Beobachtung 8 Stunden nach Beginn des Versuches: Alle Zellen im Schnitt leben, das Plasma strömt. Mittelwert von  $G$  (5 Zellen) = 0,60<sub>2</sub>.

$k_F$ : 0,09<sub>1</sub>, 0,06<sub>8</sub>, 0,13<sub>5</sub>, 0,06<sub>5</sub>, 0,05<sub>9</sub>. Mw = 0,08<sub>4</sub>.

Kontrollversuch 24 11. III. 1951 T: 16° C

Der Schnitt lag 17 Stunden in bidest. Wasser. Plasmolyse in 0,3 GM  $\text{CaCl}_2$ . Messungen in der 12. und 15. Minute. Letzte Beobachtung 6 Stunden nach Versuchsbeginn: Fast alle Zellen leben, das Plasma strömt. Mittelwert von  $G$  (6 Zellen) = 0,60<sub>5</sub>.

$k_F$ : 0,23<sub>3</sub>, 0,14<sub>7</sub>, 0,16<sub>5</sub>, 0,19<sub>1</sub>, 0,23, 0,18<sub>2</sub>. Mw = 0,19<sub>2</sub>.

Neben der hemmenden Wirkung des Harnstoffes ist bei diesen Versuchen auch gut die Abhängigkeit des Wirkungsgrades von der Konzen-

<sup>3</sup> Halten sich etwa Harnstoffendosmose und Exosmose von Vakuolenstoffen die Waage?

tration zu sehen. Der endgültige Grad der Hemmung ist nach 16 Stunden noch nicht erreicht, denn nach 60stündiger Vorbehandlung in den hypotonischen Lösungen sanken die Werte von  $k_E$  unter den gleichen Versuchsbedingungen bis auf  $k_E = 0,02$ , ab (vgl. Abb. 7).

## 2. Versuche mit Traubenzucker

Bei der Plasmolyse in Traubenzuckerlösungen (0,85 GM) konnten analoge Ergebnisse erzielt werden.

Die Schnitte wurden in hypotonischen Konzentrationen von 0,04 und 0,08 GM vorbehandelt. Die Plasmolyse und gleichzeitige Messung der Eintrittskonstanten erfolgte sodann in 0,85 GM Traubenzucker. Zellen, die in 0,04 GM Traubenzucker lagen, zeigten auch nach Wirkungszeiten bis zu 20 Stunden keine Veränderung der Wasserpermeabilität und unterschieden sich von den Kontrollversuchen äußerlich nur durch das frühzeitige Einstellen der Plasmaströmung. Dies geschah oft schon 20 Minuten nach Versuchsbeginn, während bei den in 0,08 GM vorbehandelten Zellen die Strömung bis über die Meßzeit hinaus andauerte.

Die osmotischen Werte der vorbehandelten Zellen erlitten, wie nicht anders zu erwarten, keine Veränderung. Dagegen macht sich der Einfluß der hypotonischen Traubenzuckerlösung von 0,08 GM in einer Hemmung der Wasserpermeabilität bemerkbar, die auch nach längerer Wirkungszeit keiner weiteren Steigerung unterworfen ist.

## Schlußbesprechung und Zusammenfassung

Eine Beeinflussung der Wasserpermeabilität des Protoplasmas nach Vorbehandlung der Zellen in hypotonischen Neutralsalz- und Nichtleiterlösungen konnte sicher festgestellt werden. Sowohl bei *Salvinia natans* wie bei *Allium cepa* ist ein solcher Nachweis erbracht worden.

Als Vergleichsmaßstab zwischen vorbehandelten Zellen und der Kontrolle diente die Geschwindigkeit der Protoplastenkontraktion beim Plasmolyseeintritt bzw. Wiederausdehnung, wenn es sich um eine Messung während der Deplasmolyse handelte. Die nach der Methode Höflers (1930) berechneten Werte von  $k$  (Eintritts- bzw. Rückgangskonstante) dürfen natürlich nicht als strenges Maß der Wasserpermeabilität aufgefaßt werden (vgl. Huber und Höfler 1930). Gegen ihre Verwendung als Vergleichsmaß kann jedoch kein Einwand erhoben werden.

Rückblickend läßt sich der Einfluß der hier untersuchten Stoffgruppen (Salze und Nichtleiter) wie folgt zusammenfassen: Die Tendenz der Salze ist überwiegend, wenn man so sagen darf, auf eine Erhöhung der Wasserpermeabilität gerichtet, die der hier untersuchten Nichtleiter (Harnstoff und Traubenzucker) aber eindeutig auf eine Hemmung. Hierin unterscheidet sich die Wasserpermeabilität von der Glycerin- und Harnstoffpermeabilität, die, wie Bogen (1938, 1940) und Kreuz (1941) zeigen konnten, durch Kalziumchlorid und Traubenzucker gehemmt erscheinen. Die Wasserblattzellen von *Sal-*

*vinia natans* und die Innenepidermiszellen der Zwiebelschuppen von *Allium cepa* zeigten bei gleicher Vorbehandlung in allen Versuchen ein analoges Verhalten.

Die untere Konzentrationsgrenze der zur Vorbehandlung verwendeten Salzlösung, wo eben noch eine meßbare Wirkung beobachtet werden konnte, lag bei den zweiwertigen Salzen um 0,01 GM, bei Kaliumnitrat und den Nichtleitern aber höher.

Im einzelnen gesehen konnte bei den Erdalkalisalzen ( $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{SrCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ ) die von de Haan (1935) beobachtete Abhängigkeit des Wirkungsgrades von der Konzentrationshöhe neuerlich bestätigt werden. Höhere Konzentrationen (um 0,08 GM) riefen immer eine Erhöhung der Wasserpermeabilität hervor, während in den schwächeren Konzentrationen (um 0,04 GM) nur die in  $\text{CaCl}_2$  vorbehandelten Zellen eine Hemmung erkennen ließen. Bei diesen Versuchen zeigte sich zum erstenmal die Wichtigkeit eines weiteren Faktors, nämlich der Wirkungszeit, die mitbestimmend auf die endgültige Art und Weise der Beeinflussung ist. So nimmt bei *Salvinia natans* die nur hier nach kurzer Wirkungszeit in Erscheinung tretende Erhöhung der Wasserpermeabilität mit zunehmender Dauer der Vorbehandlungszeit wieder ab und führt schließlich zu einer deutlich meßbaren Hemmung. Bei den langsamer permeablen *Allium-cepa*-Zellen konnte allerdings dieses erste Maximum der Permeabilitäts-erhöhung nicht messend festgestellt werden, denn nach längerer Wirkungszeit war eben nur mehr der hemmende Einfluß zu beobachten.

Anders liegen die Verhältnisse beim einwertigen Alkalisalz  $\text{KNO}_3$ . Die typische Salzwirkung, wenn man so die Erhöhung der Wasserpermeabilität bezeichnen darf, gibt sich bei diesem Salz nur in den stärkeren Konzentrationen und nach kurzen Wirkungszeiten kund. Ansonsten kommt es in der überwiegenden Zahl der Versuche zu einer, wenn auch nur schwach erkennbaren Hemmung. Bei Konzentrationen unter 0,04 GM konnte bei beiden Versuchsobjekten kaum mehr ein Einfluß des  $\text{KNO}_3$  beobachtet werden. Erwähnung muß auch der Sonderfall bei *Allium cepa* finden, wo keine sichtbare Veränderung der Wasserpermeabilität zu beobachten war, wenn Vorbehandlung und nachfolgende Messung beim Plasmolyseeintritt in Kaliumnitrat erfolgten.

Wenn wir die Wirkung der hier untersuchten Salze kurz zusammenfassen, so sieht man, daß neben der Konzentrationshöhe auch die Wirkungszeit von maßgebendem Einfluß auf die endgültige Veränderung der Wasserpermeabilität des Protoplasmas ist. Während die Stärke des Einflusses proportional mit der Konzentrationshöhe des Salzes steigt, bedingen Verlängerungen der Wirkungszeiten meist eine weitere Zunahme, bisweilen aber auch eine Umkehr der einmal eingeschlagenen Richtung.

Die Beeinflussung der Wasserpermeabilität durch hypotonische Nichtleiterlösungen (Traubenzucker, Harnstoff) scheint sehr einheitlich in einer Hemmung zum Ausdruck zu kommen. Bei den Nichtleitern sind darin im Gegensatz zu den Salzen die Unterschiede in den Konzentrationshöhen belanglos. Der Hemmungsgrad selbst steigt auch bei den Nichtleitern in Proportion mit der Konzentrationshöhe. Ein sichtbarer und bemerkens-

werter Unterschied konnte zwischen Harnstoff und Traubenzucker bezüglich der Wirkungszeit beobachtet werden. Die Mindestwirkungszeit ist bei Harnstoff verhältnismäßig lang, der endgültige, keiner Steigerung mehr fähige Hemmungsgrad wird erst nach vielstündiger Vorbehandlung (15 bis 20 Stunden) erreicht. Ganz anders beim Traubenzucker, wo die Mindestwirkungszeit so kurz wie bei den Salzen ist. Dieser nach kurzer Wirkungszeit einmal eingestellte Hemmungsgrad ist dann keiner weiteren Steigerung mehr fähig.

Zur theoretischen Deutung dieser Versuchsergebnisse kann folgendes gesagt werden: Zucker wirkt auf das Cytoplasma osmotisch und wenn auch in geringem Grade entquellend. Durch dieses etwas wasserärmere Plasma geht Wasser schwerer durch. Ist der osmotische Gleichgewichtszustand erreicht, so ist ein weiteres Verweilen in der hypotonischen Zuckerlösung wirkungslos, d. h. die einmal erreichte, leicht gehemmte Wasserpermeabilität bleibt auf ihrer Höhe stehen. Bei Harnstoff, der nachweisbar permeiert, erfolgt offenbar ein Durchtritt durchs ganze Plasma. Geschieht die Permeation auf dem Lösungsweg, so muß der Harnstoff die lipoiden Phasen des Plasmas bei seinem Durchtritt passieren und er wird darin gemäß den Verteilungskoeffizienten zwischen Wasser und Lipoiden gelöst. Wir sind nun zu dem neuen und überraschenden Ergebnisse gelangt, daß Plasma, welches Harnstoff gelöst enthält, für Wasser weniger durchlässig ist, als das harnstofffreie Plasma der Kontrollen.

Welcherart sind nun die Veränderungen, die das Plasma erfährt, wenn es mit chemischen Agenzien der in dieser Arbeit besprochenen Stoffe in hypotonischer Konzentration behandelt wurde? Die hohe Empfindlichkeit des Plasmas auf physikalische und chemische Einflüsse konnte bereits in vorhergehenden Arbeiten (Seemann 1950 a, b) gezeigt werden. So erscheint die Wasserpermeabilität im Bereiche  $p_{H} 7$  am höchsten und sinkt sowohl zur alkalischen wie zur sauren Seite ab. Temperaturerhöhungen, die in ihrer Wirkung thermostabil sind, verursachen eine Erhöhung. Nicht letal wirksame UV-Bestrahlung steigert gleichfalls die Wasserpermeabilität, diese Erhöhung erhält sich und klingt aber nach Ablauf von 20 bis 24 Stunden wieder allmählich (Biebl 1942) ab. Es waren dies durchwegs Einflüsse, die von außen her die Permeabilität des Plasmas — und damit wohl auch seine Struktur — wirksam veränderten. Man könnte zwar die beobachteten Effekte auch anders, im Sinne einer leichten osmotischen Wasserentziehung wie beim Zucker, deuten — aber die mit der Zeit zunehmende Verstärkung der Wirkung spricht dafür, daß die ungleichen Verhältnisse anders liegen als bei der Wirkung des Zuckers auf das Plasma.

Eine wichtige Frage lautet weiter: Ist das Plasma als Ganzes oder sind nur einzelne Teile — wie z. B. das Plasmalemma, auf das ja alle eben besprochenen chemisch-physikalischen Komponenten zuerst auftreffen — für diese Veränderungen verantwortlich? Im Sinne der klassischen Permeabilitätslehre könnte die äußere Plasmahaut, das Plasmalemma, als einzige maßgebende Barriere angenommen werden. Allein die Ansicht, daß etwa der Einfluß der Temperatur sich nur auf die äußeren Plasmagrenzschichten beschränken würde, läßt sich kaum aufrechterhalten. Dazu kommt noch, daß



sich das Plasmalemma bei der Kontraktion des Protoplasten von der Zellwand zum Teil wieder Neubilden bzw. regenerieren muß und während dieser Zeit nur beschränkt die ihm zugeordnete Arbeit leisten kann. Gleiches gilt für die innere Abgrenzung des Protoplasten zur Vakuole, den Tonoplasten. So ist bei plasmolytischen Versuchen immer wieder zu beobachten, daß geschädigte Zellen, bei denen nur noch der lipoidreiche Tonoplast erhalten blieb, schon nach wenigen Minuten das osmotische Gleichgewicht erreichen. Bei ungeschädigten Protoplasten nimmt der gleiche Vorgang ein Vielfaches an Zeit in Anspruch. Daraus folgt, daß der Tonoplast als begrenzender Faktor für die Wasserpermeabilität nicht in Frage kommen kann. So bleibt also hierfür nur die Hauptmasse des Plasmas, das Binnenplasma, übrig, ein Umstand, auf den in der neueren Literatur (Höfler 1949, 1950) schon mehrfach hingewiesen wurde.

Die wichtige Rolle der Wirkungszeit bei Permeabilitätsstudien mit Salzen konnte in dieser Arbeit aufgezeigt werden. Wäre nur die äußere Plasmahaut für die Permeation des Wassers begrenzend, dann ist der Umstand schwer verständlich, daß erstens der hemmende oder fördernde Einfluß der hypotonischen Lösungen erst nach einer Mindestzeit der Einwirkung meßbar wird, und zweitens die Tatsache, daß die anfangs gemessene Veränderung der Wasserpermeabilität nach längerer Wirkungszeit noch Steigerungen, ja selbst einer Umkehr der ursprünglichen Beeinflussung zugänglich ist. Nehmen wir aber das vielfach mächtigere Binnenplasma als begrenzenden Faktor für den Diffusionswiderstand in Anspruch, so ist leicht einzusehen, daß zur Durchdringung dieses Plasmateiles mit den Molekülen oder Ionen aus den hypotonischen Lösungen eine mehr oder weniger lange Zeit beansprucht wird. Der Einfluß der hypotonischen Salz- und Nichtleiterlösungen sowie der oben besprochenen chemisch-physikalischen Agenzien, kommt also kaum nur in den Grenzschichten des Plasmas, sondern vor allem auch in seinem Inneren zur Wirkung. — Ob es eine Bindung durch elektroadsorptive Kräfte, Quellungserscheinung oder mechanische Verengung der Wasserwege ist, soll hier nicht diskutiert werden. Sicher ist, daß das komplizierte Geschehen im Inneren des Plasmas, welches äußerlich bei den hier besprochenen Versuchen entweder als Hemmung oder Erhöhung der Wasserpermeabilität meßbar erfaßt wurde, bei der gleichen Art der Erscheinung nicht unbedingt überall auf gleiche innere Prozesse zurückzuführen sein muß.

#### Literatur

- Biebl, R., 1942: Wirkung der UV-Strahlen auf die Plasmapermeabilität. *Protoplasma* 37, 1.
- Bochsler, A., 1948: Die Wasserpermeabilität des Protoplasmas auf Grund des Fickschen Diffusionsgesetzes. *Ber. schweiz. Bot. Ges.* 58, 73.
- Bogen, H., 1938: Untersuchungen zu den spezifischen Permeabilitätsreihen Höflers. II. Harnstoff und Glycerin. *Planta* 28, 535.
- 1940: Untersuchungen über den Quellungsseffekt permeierender Anelektrolyte. I. Ionenwirkungen auf die Permeabilität von *Rhoeo discolor*. *Zeitschr. f. Bot.* 36, 65.



- Brauner, L. u. M., 1945: Studies in the relation between water permeability and electric charge in membrane models and in living plant cells. *Revue Fac. scient. de L'Univ. d'Istanbul. Serie B VII, 4*, 1945.
- Cholodny, N., und E. Sankewitsch, 1933: Plasmolyseform und Ionenwirkung. *Protoplasma* 20, 57.
- Delf, E. M., 1916: Studies of protoplasmic permeability by measurement of rate of shrinkage of turgid tissues. *Ann. Botany* 30, 285.
- Fitting, H., 1915: Untersuchungen über die Aufnahme von Salzen in die lebende Zelle. *Jahrb. wiss. Bot.* 56, 1.
- Gellhorn, E., 1929: Das Permeabilitätsproblem. Berlin.
- Guttenberg, H. v., und A. Beythien, 1951: Über den Einfluß von Wirkstoffen auf die Wasserpermeabilität des Protoplasmas. *Planta* 40, 36.
- Haan, Iz. de, 1935: Protoplasmaquellung und Wasserpermeabilität. *Rec. de trav. bot. Néerl.* 30, 234.
- 1934: Kappenplasmolyse und Wasserpermeabilität. *Protoplasma* 22, 395.
- 1935: Ionenwirkung und Wasserpermeabilität. Ein Beitrag zur Koazervattheorie der Plasmagrenzschichten. *Protoplasma* 24, 186.
- Höber, R., 1926: Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe. 6. Auflage. Leipzig.
- Höfler, K., 1928: Über Kappenplasmolyse. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 46, 73.
- 1930: Über Eintritts- und Rückgangsgeschwindigkeit der Plasmolyse und eine Methode zur Bestimmung der Wasserpermeabilität des Protoplasten. *Jahrb. wiss. Bot.* 73, 300.
- 1934: Permeabilitätsstudien an Stengelzellen von *Majanthemum bifolium*. (Zur Kenntnis spezifischer Permeabilitätsreihen I.) *Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien, math.-nat. Kl., I. Abt.* 143, 213.
- 1949: Über Wasser- und Harnstoffpermeabilität des Protoplasmas. *Phyton* 1, 105.
- 1950: New Facts on Waterpermeability. *Protoplasma* 39, 677.
- und F. Weber, 1926: Die Wirkung der Äthernarkose auf die Harnstoffpermeabilität von Pflanzenzellen. *Jahrb. wiss. Bot.* 65, 643.
- Hofmeister, L., 1935: Vergleichende Untersuchung über spezifische Permeabilitätsreihen. *Biblioth. bot.* 113, 1—83.
- Houska, H., 1939: Zur protoplasmatischen Anatomie der Küchenzwiebel. *Österr. Bot. Zeitschr.* 88, 161.
- 1941: Beiträge zur Kenntnis der Kappenplasmolyse. *Protoplasma* 36, 11.
- Huber, B., und K. Höfler, 1930: Die Wasserpermeabilität des Protoplasmas. *Jahrb. wiss. Bot.* 73, 351.
- Kaho, H., 1937: Ein Beitrag zur Kenntnis der Wasserpermeabilität des Protoplasmas. *Cytologia, Fujii jub. vol.*, 129.
- Krabbe, G., 1896: Über den Einfluß der Temperatur auf osmotische Prozesse lebender Zellen. *Jahrb. wiss. Bot.* 29, 441.
- Kreuz, J., 1941: Der Einfluß von Calcium- und Kalium-Salzen auf die Permeabilität des Protoplasmas für Harnstoff und Glycerin. *Österr. Bot. Zeitschr.* 90, 1.
- Lepeschkin, W., 1924: Kolloidchemie des Protoplasmas. Berlin.
- 1938: desgl. 2. Aufl. *Wiss. Forschungsberichte* 47, Dresden-Leipzig.
- Levitt, J., G. W. Scarth and R. D. Gibbs, 1936: Water permeability of isolated protoplasts in relation to volume change. *Protoplasma* 26, 237.
- Rottenburg, W., 1943: Die Plasmapermeabilität für Harnstoff und Glycerin in ihrer Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration. *Flora N. F.* 37, 230.

Rysselberghe, F. van, 1901: Influence de la température sur la perméabilité du protoplasme vivant pour l'eau et les substances dissoutes. Rec. de l'Inst. Bot. Bruxelles 5, 209.

Seemann, F., 1950 a: Zur  $c_H$ -Abhängigkeit der Wasserpermeabilität des Protoplasmas. Protoplasma 39, 147.

— 1950 b: Der Einfluß der Wärme und UV-Bestrahlung auf die Wasserpermeabilität des Protoplasmas. Protoplasma 39, 535.

Stiles, W., and J. Jörgensen, 1917: Studies in Permeability. V. Ann. of Bot. 31, 415.

Toth, A., 1949: Quantitative Untersuchungen über die Wirkung der UV-Bestrahlung auf die Plasmapermeabilität. Österr. Bot. Zeitschr. 96, 161.

Weber, F., 1924: Plasmolyse und Protoplasmaviskosität. Österr. Bot. Zeitschr. 72, 261.

# Untersuchungen über die Cytodynamik der Plasmogamie und temporären „Plasmabrücken“ bei *Actinosphaerium eichhorni* Ehrbg. unter Änderung des Zeitfaktors mittels des Zeitrafferfilms

Von

Willi Kuhl

(Unter Mitarbeit von Gertrud Kuhl)

Aus dem Institut für kinematische Zellforschung in Frankfurt a. M.

Mit 16 Textabbildungen

(Eingelangt am 8. August 1952)

Inhalt	Seite
Einleitung . . . . .	133
I. Technik der Untersuchung . . . . .	134
II. Plasmogamie zwischen zwei Partnern . . . . .	134
III. Plasmogamie zwischen mehreren Partnern . . . . .	158
IV. Trennungen . . . . .	161
V. Gleichzeitige Plasmogamie und Trennung . . . . .	165
VI. Bildung von temporären „Plasmabrücken“ zwischen zwei Tieren mit nachfolgender Trennung . . . . .	169
VII. Aneinander-Vorbeigleiten ohne „Brückenbildung“ unter Verbiegung der Axopodien: „Phobie“ . . . . .	184
VIII. Beobachtungen an encystierten Tieren . . . . .	186
IX. Bemerkungen über den „Individualbegriff“ und die verschiedenen Altersstufen bei <i>Actinosphaerium eichhorni</i> Ehrbg. . . . .	187
X. Zusammenfassung . . . . .	190
Literatur . . . . .	192

## Einleitung

Im Rahmen einer planvollen „Abtastung“ der lebenden polyenergiden Zelle von *Actinosphaerium eichhorni* Ehrbg. unter Änderung des menschlichen Zeitfaktors mit Hilfe des Zeitrafferfilms werden in dieser Arbeit erstmalig die für gewisse *Heliozoen* charakteristischen Verschmelzungen ganzer „Individuen“, die Plasmogamien, genauer in ihrer Mikrodynamik analysiert unter Einbeziehung der häufig auf die Totalverschmelzung folgenden Trennungen der Tiere.

Im Laufe der Verfolgung dieser offenbar bis jetzt verhältnismäßig wenig beachteten Vorgänge enthüllte der Mikrozeitrafferfilm bemerkenswerte Verhaltensweisen der Tiere, die unter zunächst noch unbekannten Bedingungen einsetzen und zur Bildung von temporären „Plasmabrücken“ führen, die im Zeitrafferlaufbild lebhaft Bewegungen ausführen. Über die „Funktion“ dieser plasmatischen Verbindungsstränge kann zur Zeit noch nichts Sicheres ausgesagt werden. Bei subjektiver Beobachtung können die hier mitgeteilten Bewegungsvorgänge nicht wahrgenommen werden. Erst eine geeignete Zeitraffung bringt die mikrodynamischen Bewegungsabläufe zur Anschauung. Alle Bewegungsvorgänge betreffenden Ausdrücke beziehen sich demnach nur auf das Zeitrafferlaufbild. (Inzwischen ist ein Hochschulfilm über *Actinosphaerium eichhorni* erschienen (C 627).

### I. Technik der Untersuchung

Die *Actinosphaerien* wurden in filtriertem Wasser ihres Zuchtaquarium in gewöhnlichen Deckglas- oder Glasringpräparaten (35 mm hoher Glasring, 16 mm innerer Durchmesser, mit Paraffin auf den Objektträger geklebt; Deckglas schließt völlig ab, ohne Luftblase) untersucht und gefilmt. Die Deckgläser der gewöhnlichen Präparate waren an den vier Ecken mit kleinen Paraffinfüllchen versehen und trugen 2—4 weitere Paraffintropfchen gleichmäßig auf die Fläche verteilt, um ein Durchbiegen der großen Deckgläser zu verhindern. Die Geschwindigkeit der unter Zeitraffung aufgenommenen langsamen Vorgänge ist im Laufbild meist 40fach, in einem Falle 218fach. Die Autotypen wurden von Abzügen einzelner Teilbilder des Originalfilm-Negativs (35 mm) hergestellt.

### II. Plasmogamie zwischen zwei Partnern

Unter Plasmogamie versteht man die Verschmelzung der gesamten Zellkörper freier Zellen.

„Besonders bei *Thecamoeben* sind unter dem Namen Plasmogamie bekannte Vorgänge verbreitet (wobei zwei bis viele Individuen verschmelzen), die früher vielfach als Wurzel der Befruchtungsvorgänge angesehen wurden, jedoch nichts damit zu tun haben. Sie treten nur bei ungünstigen Lebensbedingungen auf“ (M. Hartmann 1933).

In den Lehrbüchern wird oft die Meinung vertreten, daß die Verschmelzung ganzer „Individuen“ von *Heliozoen* und anderen *Rhizopoden* hauptsächlich oder nur bei der Überwältigung besonders großer Beuteobjekte zu beobachten sei; die Plasmogamie zweier oder mehrerer Tiere habe die Funktion einer „Freßgemeinschaft“. Dies mag für manche Arten richtig sein, für andere jedoch nur mit Einschränkung oder überhaupt nicht.

Im Schrifttum herrscht keine Begriffsklarheit über „Teilung“, Plasmogamie, „Konjugation“; sie wäre allmählich dringend notwendig. Bereits Eichhorn (1783) beobachtete die „Teilung“ von *Actinosphaerium eichhorni*. 1849 sah Kölliker die Verschmelzung von zwei Individuen, und es erschien bereits fraglich, ob nicht alle Trennungsvorgänge als Konjugationsakte zu deuten seien. Greef (1871) rechnet die Verschmelzung zu den Teilungsvorgängen; die entstandenen „Hälften“ verschmolzen

wieder infolge von „Beunruhigung“ der Tiere. Dies soll aber nur für die Fälle gelten, bei denen „biskuitförmige“ Exemplare zu einem runden verschmolzen, keinesfalls jedoch für solche, die ein „langsameres Ineinanderaufgehen“ zunächst völlig getrennter Tiere zeigten, was seltener vorkommen soll als Teilung. Nach Brandt (1877) können bei großer Annäherung zweier Tiere die Axopodien z. T. verschmelzen; manchmal tritt in der Berührungsebene eine gegenseitige Abplattung ein, trotzdem kein Verschmelzen, sondern ein langsames Auseinanderrücken. Bei inniger Vereinigung ist keine Spur mehr zu erkennen, daß zu Anfang zwei Tiere vorlagen. Infolge der Verschmelzung der „Rindensubstanz“ wird in anderen Fällen Biskuitform angenommen. An der Verschmelzungsstelle ist dann der sonst so scharfe Unterschied von „Mark- und Rindensubstanz“ so stark verwischt, daß keine Unterscheidung mehr möglich ist, ob nur die Rinden- oder auch die Markscheid verschmolzen waren. Nach einigen Stunden erfolgte die Trennung. Brandt läßt keine Beziehungen bestehen zwischen den Verschmelzungsvorgängen und der Fortpflanzung.

Penard (1889) beobachtete bei *Actinophrys sol* sehr häufig Näherung und Verschmelzung. Seine Bezeichnung „Konjugation“ entspricht dem Begriff Plasmogamie und ist insofern unkorrekt, als unter „Konjugation“ üblicherweise ein vorübergehendes Aneinanderlegen zweier Einzeller (Ciliaten) unter Bildung einer temporären Plasmabridge verstanden wird, die dem Kernaustausch dient. Penard hält den Verschmelzungsvorgang für recht verwickelt. Nach der Annäherung der Tiere erfolgt Berührung einiger Axopodien untereinander und eine Anheftung von Axopodien auf der Ektoplasmaoberfläche des anderen Tieres. Hierbei können auch Anastomosen zwischen den Axopodien eintreten. Bei *Actinophrys sol* ziehen sich bei der „Konjugation“ — besser Plasmogamie — die Partner gegenseitig mit Hilfe der Axopodien an und nähern sich schnell. Die Verschmelzung soll bei diesem *Heliozoon* nie bis zur Erreichung der völligen Kugelgestalt führen. Bei unserem Zeitrafferfilm über die Plasmogamie von *Actinophrys sol* wurde immer die Kugelgestalt erreicht! Nach Penard ziehen sich in der Verschmelzungszone die Axopodien allmählich zurück und verschwinden schließlich. Bei der Vereinigung sollen sich die Kerne „nähern“, jedoch Abstand behalten. Dieser Zustand kann sehr lange anhalten, oft erfolgt aber auch die Trennung bereits wieder nach kurzer Zeit. Dann wird eine Einschnürung sichtbar, die Entoplasmen „trennen“ sich; dann erfolgt die Trennung der „Ektoplasma-Vakuolen“.

Der dünne, mattgraue Faden reißt sehr spät ab. Massenvereinigung von *Actinophrys sol* nennt Penard (1889) „Koloniebildung“. Sie hat nichts mit der Fortpflanzung zu tun, soll jedoch „nützlich“ für das Tier sein, indem ihm „neue Kräfte“ eingeflüßt werden. Diese „Kolonien“ brauchen riesige Mengen von Beute.

Bei eigenen Untersuchungen an *Actinophrys* mit Hilfe der Zeitraffung waren auch bei Massenplasmogamien keine Beuteobjekte anwesend wie bei *Actinosphaerium*.

Als historische Reminiszenz sei mitgeteilt, daß Penard die „Kolonie“ von *Actinophrys* mit einem *Actinosphaerium* vergleicht, das vielleicht nur eine in der Entwicklung fixierte Kolonie von *Actinophrys* sei!

Im Zuchtquarium „vermehrten“ sich die *Actinosphaerien* sehr stark bzw. es schlüpften im Laufe von mehreren Wochen sehr viele Cysten; es kann demnach hier nicht von ungünstigen Lebensbedingungen gesprochen werden. Sowohl im geräumigen Aquarium wie auch unter dem Deckglas wurden ständig Plasmogamien von zwei, mehreren und vielen Tieren beobachtet, ohne daß irgendein Beuteobjekt dabei eine Rolle spielte. Lagen



die *Actinosphaerien* nur nahe genug beieinander, so waren offenbar die Bedingungen zur Einleitung dieses eigenartigen, noch keineswegs in seiner Bedeutung verstandenen Vorganges gegeben. Übrigens wurde auch bei *Actinophrys sol* sehr häufig Plasmogamie von zwei oder drei Individuen unter dem Deckglas beobachtet und auch unter Zeitraffung gefilmt, ohne daß eine „Freßgemeinschaft“ vorlag, also ebenfalls in Abwesenheit irgendeines Beuteobjektes (dieser Mikrozeitrafferfilm ist leider verbrannt).

Die Anwendung des Zeitrafferfilms hat sich zur Analyse der Bewegungsphysiologie des Plasmogamievorganges, der offenbar wesentlich verwickelter ist, als man bisher annahm, wiederum sehr bewährt, indem

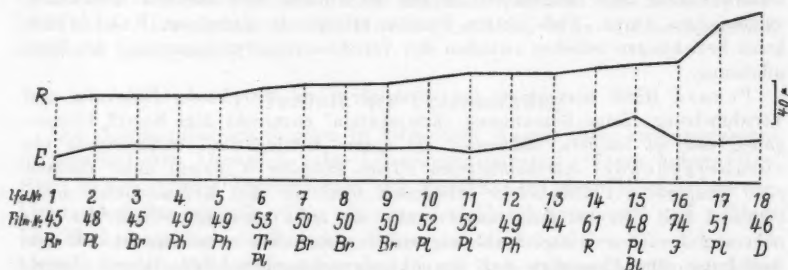


Abb. 1. Darstellung der Beziehung zwischen Größe und Höhe des Ektoplasma von *Actinosphaerium eichhorni*. Jede gestrichelte Ordinate entspricht einem Tier. Obere Kurve: Werte für den Radius  $R$ ; untere Kurve: Dicke der Rindenschicht  $E$  (Ektoplasma). Die 18 Tiere wurden nicht experimentell beeinflusst.

a: Anordnung nach steigenden Werten für den Radius  $R$  (Repräsentant der Größe). Bis Nr. 11 ausschließlich: Klarer Parallelverlauf von  $R$  und  $E$ . Der Wert für  $R$  steigt stärker an als  $E$ . Ab Nr. 11 stärkerer Anstieg von  $E$  bis zum Extremwert für  $E$ : Nr. 15 (offenbar pathologischer Fall: Ektoplasma-„Blase“). Nr. 14 zeigt relativ hohe Werte für  $E$  (in Rückbildung begriffen), ferner das junge Tier Nr. 16. —  $Bl$ : Tier mit blasigem Ektoplasma.  $Br$ : Temporäre Plasmabrücke.  $D$ : Defäkation.  $J$ : Junges Tier.  $Ph$ : Phobie.  $Pl$ : Plasmogamie.  $R$ : Beginnende Rückbildung.  $Tr$ : Trennung.

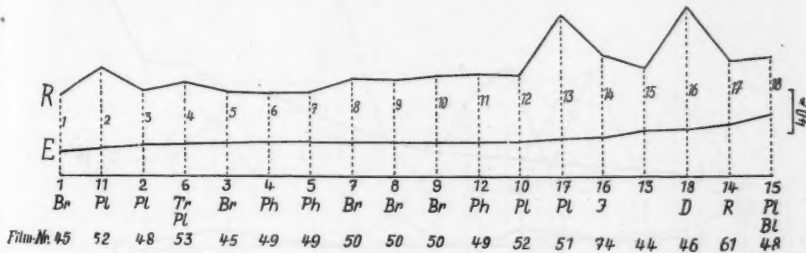
durch die Änderung des Zeitfaktors die wirkliche Mikrodynamik des Vereinigungs- und Trennungsgeschehens erkennbar wird.

Werden in einer „individuen“-reichen Population von *Actinosphaerium*, die unter günstigen Bedingungen lebt, Tiere mit erheblichen Größenunterschieden beobachtet, so kann dieser Unterschied auf verschiedenen Altersstufen beruhen, oder aber ein Teil der besonders großen Sonnen-tierchen ist durch Plasmogamie entstanden. So ist also zunächst am lebenden Objekt eine einwandfreie Beurteilung auf Grund des Aussehens und Verhaltens noch nicht möglich, ob es sich um ein „einzelnes“ Tier oder ein durch Plasmogamie entstandenes „Gruppentier“ handelt. Der „Individualbegriff“ muß demnach hier mit besonderer Vorsicht gehandhabt werden! Dies gilt vor allem auch für Vorgänge, die den Eindruck einer Teilung machen, vielleicht aber nur die Trennung nach



vorausgegangener Plasmogamie darstellen. Sichere Klärung kann für diese Fragen nur die Einzelaufzucht bringen. Beobachtet man in einer Population relativ viele Plasmogamien, so wird es sich der Wahrscheinlichkeit nach bei der langsamen hantelförmigen Einschnürung eines Tieres und dem Auseinanderweichen unter Bildung eines dünnen Plasmastieles bis zur Lösung der Verbindung eher um die Trennung vorher verschmolzener „Individuen“ als um eine Teilung handeln, soweit die Lebendbeobachtung überhaupt hierüber Schlüsse zuläßt.

Das Vorkommen von *Actinosphaerien* verschiedener Größe (gemessen am Radius  $R$  ihrer Kugelgestalt) läßt die Frage nach der relativen Höhe



b: 2. Anordnung der 18 *Actinosphaerien* nach steigenden Werten für die Dicke des Ektoplasma  $E$ . Der Radius  $R$  zeigt jetzt einen erheblich gebrocheneren Kurvenverlauf als in a. Gleiche Nummernbezeichnung der Tiere wie in a (laufende Numerierung). Abkürzungen wie in a. Teilstrich = 0,04 mm.

der Rindenschicht, des Ektoplasma, entstehen. Nach der Methode der „graphischen Form- und Korrelationsanalyse“ (W. Kuhl 1928) lassen sich gesetzmäßige Beziehungen (Korrelationen) zwischen beliebig vielen Merkmalen auch an zahlenmäßig geringem Material feststellen. Bei *Actinosphaerium* kommt nur der Radius  $R$  und die Dicke des Ektoplasma  $E$  in Betracht. Andere Merkmale, z.B. Anzahl der Nahrungsvakuolen und Axopodien, können an den hier untersuchten Teilbildern, die ja optische Schnitte darstellen, nicht zahlenmäßig exakt erfaßt werden.

Bei der hier zu behandelnden Plasmogamie, bei den Trennungen und bei den in einer besonderen Abhandlung zu analysierenden Versuchen liegen immer mehrere Tiere, mindestens zwei, vor, die oft sehr verschieden groß sind. Es empfiehlt sich daher, an dieser Stelle in den graphischen Darstellungen 1 und 2 die jeweiligen Beziehungen zwischen der Größe der Tiere — ausgedrückt durch den Radius  $R$  — und der Dicke des Ektoplasma  $E$  für sämtliche unter Zeitraffung aufgenommene *Actinosphaerien* anzugeben. Abb. 1, a, b stellt 18 Tiere (Ild. Nr. 1—18) dar, die unter Zeitraffung ohne irgendwelche Beeinflussung aufgenommen wurden. Die Einstellungs-Nummer steht jeweils unter der laufenden Nummer. Darunter ist in den Abkürzungen das jeweilige Geschehen ablesbar. Abb. 2, a, b gibt die Maße für  $R$  und  $E$  von 15 *Actinosphaerien* an, die experimentell beeinflusst und unter Zeitraffung gefilmt wurden.

In Abb. 1, a sind die 18 unbeeinflussten Tiere nach ansteigenden Werten für den Radius  $R$ , also nach der Größe, angeordnet (obere Kurve); die Werte für die Höhe des Ektoplasma  $E$  überschreiten nur in drei Fällen  $40\mu$ . Der größte Wert für  $E$  (Tier 15, Einstellung 48) findet sich bei einem Tier, das eine starke Störung der Ektoplasmastruktur in Form einer blasenartigen Vorwölbung aufweist, trotzdem aber eine Plasmogamie eingeht (Abb. 6). Nr. 14 (Einstellung 61) ist vielleicht ein frühes „Rückbildungsstadium“. Die Höhe des Ektoplasma ist hier nur um  $10\mu$  kleiner als der Radius. Nr. 16 ist offenbar ein junges Tier.

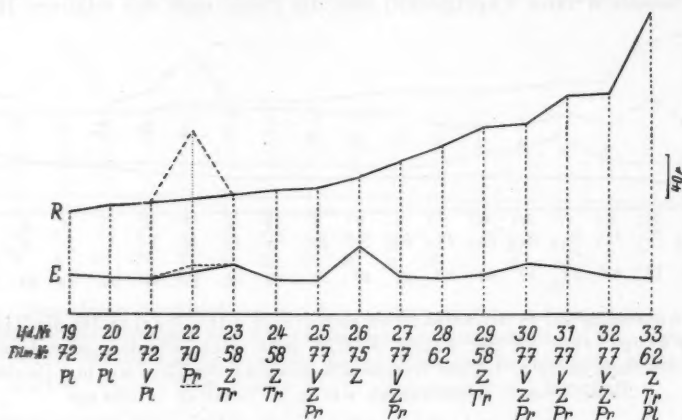


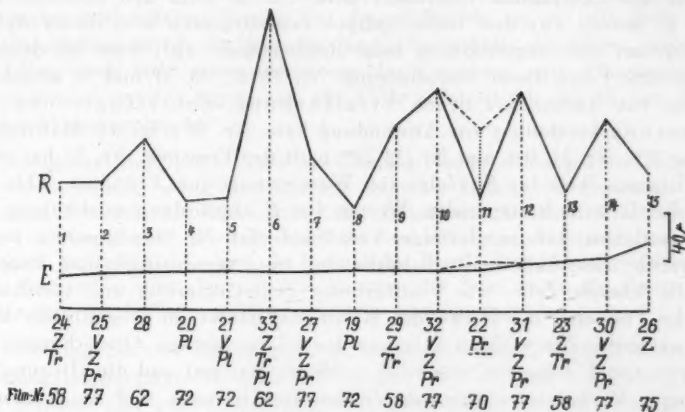
Abb. 2. 15 experimentell beeinflusste *Actinosphaerien* (Nr. 19–33) in der gleichen graphischen Darstellung wie in Abb. 1.

a: Anordnung nach steigenden Werten für den Radius  $R$  (obere Kurve).  $E$ : Höhe des Ektoplasma (untere Kurve). — Pl: Plasmogamie. Pr: Pressungsversuch. Tr: Trennung. V: Vitalfärbung mit Neutralrot Z: Zentrifugierungsversuch.

Aus der Abbildung geht hervor, daß die beiden größten Tiere, Nr. 17 und 18, keineswegs die höchsten Werte für  $E$  aufweisen. Von Nr. 2 bis Nr. 12 bleiben die Werte für die Dicke des Ektoplasma im wesentlichen konstant. Die größte Störung der  $E$ -Kurve liegt bei Nr. 15 („Blase“ im Ektoplasma). Nr. 14 und Nr. 16 mit den nächsthöheren Werten für  $E$  befinden sich gerade in besonderen Lebensphasen: beginnende Rückbildung und offenbar junges Stadium. Denkt man sich Nr. 14, 15 und 16 aus der Tabelle entfernt, so ergibt sich ein fast störungsfreier, langsam ansteigender Verlauf für  $E$ , d. h. im allgemeinen zeigen größere Tiere auch höhere Werte für die Dicke der Rindenschicht (Ausnahme: Nr. 11).

Abb. 1, b zeigt die Umordnung der 18 Tiere nach steigenden Werten von  $E$ . Nr. 15, das Tier mit der offenbar nicht normalen „Blasenbildung“ im Ektoplasma (s. Abb. 6), das trotz dieser Störung eine Plasmogamie durchführen konnte (Einstellung 48), steht jetzt am Ende der Reihe; sein nor-

malen „Plasmogamie-Partner“, Nr. 2, befindet sich an 3. Stelle. Von hier ab bis zur 12. Ordinate (Nr. 10) verlaufen *R* und *E* in guter Korrelation der beiden registrierten Merkmale, indem beide Werte nahezu gleichförmig ansteigen. Die beiden größten Tiere, Nr. 17 und 18, stehen jetzt nicht mehr nebeneinander, sondern an 15. und 16. Stelle. Abb. 1, *b* zeigt sehr deutlich, daß bei den hohen Werten für *E* keine korrelativen Beziehungen zum Radius bestehen. Von Nr. 17 (13. Ordinate in *b*) wissen wir, daß eine Plasmogamie stattgefunden hat, daß also zum mindesten ein Doppeltier vorliegt. Nr. 18 (16. Ordinate in *b*) scheint seiner Größe nach (320  $\mu$ ) eben-



*b*: 2. Anordnung der 15 *Actinosphaerien* nach steigenden Werten für die Dicke des Ektoplasma *E*. Gleiche Nummernbezeichnung der Tiere wie in *a*, nur in anderer Reihenfolge. Gleiche Abkürzungen wie in *a*. Teilstrich = 0,04 mm.

falls aus einer oder mehreren Plasmogamien hervorgegangen zu sein. Dieses Tier zeigte sehr instruktiv den Vorgang der Defäkation.

In der graphischen Darstellung benachbarte *Actinosphaerien* zeigen jeweils größere Werte für *E* und sind wesentlich kleiner als Nr. 18. Eine genaue Feststellung, ob ein großes Tier infolge normalen Wachstums oder durch Plasmogamien sein Volumen erreicht hat, läßt sich nur durch Massenaufnahmen unter Zeitraffung, die später einer genauen, messenden Teilbildanalyse (W. Kuhl) unterworfen werden können und bei denen das Schicksal eines jeden „Individuums“ bekannt ist, erzielen. Dies muß späteren Untersuchungen vorbehalten bleiben. Die Methode der graphischen Form- und Korrelationsanalyse (W. Kuhl) wird sich hier in Verbindung mit Zeitrafferfilm-Aufnahmen und Teilbildanalyse als sehr zweckmäßig erweisen.

Abb. 1 möge nur als tastender Vorversuch und als Anregung zur Klärung der hier vorliegenden, sehr verwickelten Korrelationsverhältnisse angesehen werden. Wesentlich ist hier die Feststellung, daß die Höhe der

Ektoplasmaschicht nicht in gleichem Maße zunimmt wie die Größe des Tieres, d. h. der Wert für die Dicke der Rindenschicht geht über ein gewisses Maß nicht hinaus. In Abb. 2, a der experimentell beeinflussten *Actinosphaerien* gehören die beiden ersten Tiere (Nr. 19 und 20) eigentlich noch in Abb. 1, a, und zwar in die Gegend von Nr. 10 und 11; sie wurden nicht beeinflusst, plasmogamierten aber mit dem mit Neutralrot vital gefärbten Tier Nr. 21. Die Abb. 1 würde durch das Einfügen von Nr. 19 und 20 nicht wesentlich verändert werden. Nr. 22 läßt, vorausnehmend, erkennen, in welchem Umfange durch Pressung des Tieres die Höhe des Ektoplasma vergrößert wird. Nr. 26 zeigt den höchsten Wert für  $E$ ; bereits vor dem halbstündigen Zentrifugieren wies dieses *Actinosphaerium* eine ungewöhnlich hohe Rindenschicht auf; diese ist demnach nicht eine Folge dieser Beeinflussung. Nr. 25, 27, 30, 31 und 32 zeigen die Maße von Tieren, bei denen Vitalfärbung, Zentrifugierung und Pressung kombiniert zur Anwendung kam. Nr. 30 zeigt die Maßverhältnisse  $37^m$ , Nr. 31  $46^m$  und Nr. 32  $22^m$  nach der Pressung. Nr. 32 hat einen niedrigeren Wert für  $E$  infolge von Wasserzusatz zum Präparat. Abb. 2, a ist ebenfalls nach steigenden Werten für  $R$  angeordnet, unabhängig von der zeitlichen Aufeinanderfolge. Vom Sonderfall Nr. 26 abgesehen, veranschaulicht diese Tabelle die Tatsache, daß trotz verschiedenartiger Eingriffe in die lebende Zelle, wie Vitalfärbung, Zentrifugierung und verschieden starke Pressung, die Höhe der Rindenschicht im wesentlichen konstant bleibt. Zur exakten Deutung der relativ kleinen Abweichungen des Wertes von  $E$  wäre ein wesentlich größeres Material und die Hinzunahme weiterer Merkmale erforderlich. Zu beachten ist noch, daß das kleinste *Actinosphaerium*, Nr. 19, sogar eine höhere Ektoplasmaschicht aufweist als das größte, Nr. 33.

Abb. 2, b stellt die Umordnung der 15 Versuchsobjekte nach steigenden Werten für die Höhe des Ektoplasma  $E$  dar. Wesentlich deutlicher als in a wird hier die Konstanz der Dicke des Ektoplasma demonstriert, trotz der erwähnten drei verschiedenen Eingriffe. Bei unbeeinflussten Tieren ging aus der Darstellung Abb. 1, a und b immerhin ein Ansteigen von  $E$  bei zunehmender Größe von  $R$  hervor. Unter den 15 Tieren von Abb. 2, a und b weisen sechs Übergröße auf (Nr. 28, 29, 30, 31, 32 und 33); sie wurden sämtlich zentrifugiert und dadurch leichter zur Plasmogamie gebracht, drei (Nr. 30, 31 und 32) wurden gepreßt und dadurch vergrößert.

Die Ektoplasma- und Entoplasma-Verhältnisse der infolge der Zentrifugierung zusammengeführten Ausgangs-Individuen sind nicht gemessen worden; eine Form- und Korrelationsanalyse größeren Umfangs lag ja auch nicht im Plane dieser Arbeit. (Es wird auf die demnächst erscheinende Zeitrasterfilm-Untersuchung über die Wirkung von Zentrifugierung und Pressung auf die Plasmastrukturen, den Plasmogamieablauf und die Zellrestitution bei *Actinosphaerium* verwiesen. Nozawa (1958) unternahm es, die bisher nur für die Dimensionen von Längen und Flächen von Organen der Metazoen aufgestellte Formel  $y = b x^k$  auf die Volumverhältnisse des Ekto- und Entoplasma von *Actinosphaerium* anzuwenden und ihre Gültigkeit festzustellen. ( $y$  = Volumen des Ektoplasma,  $x$  = Volumen des Entoplasma;  $b$  und  $k$

sind Konstanten, die sich jedoch von Zucht zu Zucht und gemäß den jeweiligen Außenbedingungen verändern können.)

In zwei weiteren Arbeiten vervollständigte Nozawa (1940) seine Messungen an *Actinosphaerium*. Das Verhältnis von Ekto- und Entoplasma soll sich im Laufe der individuellen Entwicklung ändern. Am kleinsten ist der Wert vor der Teilung (maximal große Tiere), am größten nach der Teilung. Die Teilung bewirke durch die Änderung der Ekto-Entoplasma-Relation eine Verjüngung infolge der relativen Vergrößerung des Ektoplasmaanteiles. Nozawa vergleicht das Ektoplasma von *Actinosphaerium* funktionell mit der Zelloberfläche der Metazoenzellen.

So wertvoll die Berechnung derartiger Verhältniszahlen für die Klärung der vielen noch offenen Fragen bei den *Heliozoen* ist, so tritt doch eine Wertminderung durch die Tatsache ein, daß vorläufig die echte „Teilung“ im Leben noch nicht einwandfrei von der Trennung nach Plasmogamien unterschieden werden kann. Auf alle Fälle ist wohl der Begriff der „Verjüngung“ unangebracht.

Der gleiche Autor stellte (1940) am lebenden Objekt Messungen der Zellgröße an; die Kerngröße wurde an sorgfältig fixiertem Zellmaterial gemessen. Zellvolumen, Zelloberfläche, Kernvolumen und Anzahl der Kerne wurden nach der Huxleyschen Formel  $y = b \cdot x^a$  berechnet und dabei eine konstante Beziehung zwischen Kernvolumen — bzw. der Anzahl der Kerne — und der Oberfläche der Zelle festgestellt, nicht aber mit dem Volumen der Zelle, womit die älteren Anschauungen von Doflein und Reichenow bestätigt wurden.

Der Eindruck der Bewegungen von zwei und gegebenenfalls mehreren Plasmogamiepartnern im Zeitrafferlaufbild ist recht eigenartig. Selten bewegen sich zwei Tiere geradlinig aufeinander zu und verschmelzen sofort zu einem Doppeltier. Meist bewegt sich ein „Partner“ um den anderen in einer sehr anmutigen, schwebenden, fast tänzelnd zu nennenden Weise. Es können mehrere, allmählich enger werdende Spiralen beschrieben werden, die schließlich zur direkten Berührung führen. Auch beide Partner können sich umeinander in den erwähnten Spiralen bewegen und schließlich zur Vereinigung kommen (s. W. Kuhl 1951).

Ferner zeigt das Zeitrafferlaufbild noch das folgende, allerdings nicht sehr häufige Verhalten von zwei Tieren. Beide nähern sich, ohne die genannten spiraligen Bahnen zu durchmessen. Offenbar kurz vor der Berührung weichen sie häufig voreinander zurück (im Zeitrafferlaufbild mit einem „Ruck“), nähern sich wiederum langsam, entfernen sich von neuem, schweben aufeinander zu usw. Dieses eigenartige Verhalten kann sich vier- bis fünfmal wiederholen, schließlich zur Plasmogamie führen oder zur endgültigen Entfernung bzw. Indifferenz.

Der Vorgang kann auch derart ablaufen, daß das eine Tier fast völlig ruhig liegt und die rhythmische Annäherung und Entfernung nur von dem anderen Partner aktiv ausgeführt wird (s. Einstellung 45 und 50, Abb. 13 und 12). Erst bei stärkerer Vergrößerung können die mikrodynamischen Vorgänge, die oft zur „temporären Brückenbildung“ führen, durch Laufbild- und Teilbildanalyse klargestellt werden, soweit die Strukturänderungen und die rein bewegungsphysiologischen Komponenten in Frage kommen.



Die Bewegungsart der *Actinosphaerien* wurde genau untersucht bei W. Kuhl (1951).

Bereits bei schwacher Vergrößerung läßt sich bei der Anwesenheit mehrerer Tiere im Glasringpräparat oder auch unter dem Deckglas eine verschiedene „Bereitschaft“ der *Actinosphaerien* zur Plasmogamie beobachten.

Von sofort wirksamer „Verschmelzungstendenz“ über ein indifferentes Verhalten zu einer als „Phobie“ anzusprechenden Verhaltensweise lassen sich Übergänge im Zeitrafferlaufbild feststellen und in eine Reihe ordnen.

Eine vollkommene Verschmelzung zweier „Individuen“ von *Actinosphaerium* ist ein wesentlich verwickelterer Vorgang als z. B. die Vereinigung zweier „nackter“ Amöben. Der bei *Actinosphaerium* verwirklichte seltene Fall der Differenzierung eines gegen mechanische Insulte äußerst widerstandsfähigen grobvakuolisierten Ektoplasma (Pressungs- und Zentrifugierungsversuche) erfordert bei der Plasmogamie: 1. Die Beseitigung der starr-elastischen Axopodien in der Berührungzone durch „Einschmelzen“, d. h. Überführen in den Solzustand. 2. Die cytologische Umformung des grobvakuolisierten Ektoplasma in der Kontaktzone in ein Plasma, dessen Phase überhaupt eine Verschmelzung zuläßt. Die grobalveoläre Struktur der Rindenschicht mit zahlreichen „prall gefüllten“ und gegeneinander abgeplatteten Flüssigkeitsvakuolen (Alveolen und Vakuolen bedeutet hier das gleiche) von durchschnittlich  $15-20\ \mu$  Größe stellt zweifellos ein für die Verschmelzung denkbar ungeeignetes Cytoplasma dar! Daß die Alveolen des Ektoplasma hinsichtlich Lage und Größe sehr konstant sind und sich ohne experimentelle Eingriffe über viele Stunden und vielleicht sogar Tage nicht verändern, beweisen einwandfrei unsere Mikrozeitraffer-Filmaufnahmen.

Bevor bei der Verschmelzung der Partner die beiden kugeligen Entoplasmamassen überhaupt zueinander gelangen können, muß also die einer Plasmogamie strukturell starken Widerstand leistende Ektoplasma-„Rinde“ überwunden werden. Die am Orte der ersten Berührung vorhandenen starr-elastischen Axopodien müssen bereits während der Annäherung verflüssigt werden, sonst ist eine Annäherung ja überhaupt nicht möglich (vgl. die Abb. 15 und 14: florettähnlich durchgebogene elastische Axopodien bei fehlender Verschmelzungstendenz). Das Plasma dieser Axopodien, deren genaue Zahl anzugeben nicht möglich ist (sie wächst ja bei zunehmender Größe der Berührungsfläche), verhält sich genau so wie bei der Aufnahme eines Beuteobjektes, d. h. es bewegt sich aktiv in zentripetaler Richtung und gelangt bei beiden Partnern schließlich bis zur Oberfläche des Ektoplasma. Je enger die Berührung der Partner wird, um so mehr nähern sich die verflüssigten — massenmäßig sehr geringfügigen —, aus den Axopodien hervorgegangenen, aktiv beweglichen Plasmaanteile, bis sie schließlich zur Verschmelzung kommen. Die Berührungzone verhält sich bei den beiden Partnern so, als ob jederseits ein großes Beuteobjekt aufgenommen werden soll. Es liegt ja durchaus in der Reaktionsnorm der



Axopodien, sich bei bestimmten Berührungsreizen zu verflüssigen. Die Reihenfolge dieser mikrodynamischen Vorgänge während der frühen Phase einer Plasmogamie kann zunächst nur erschlossen werden, der direkten Beobachtung sind sie auch im Mikrozeitraffer-Film noch nicht zugänglich.

Der innige Kontakt dieses eingeschmolzenen Axopodienplasma mit der „Pellicula“ der Oberfläche des Ektoplasma ist nun offensichtlich der adäquate Reiz für dieses, die Überführung der mechanischen Widerstand leistenden Alveolenwände in der Kontaktzone in ein dünnflüssigeres Plasma einzuleiten. Ob und in welcher Weise dabei die ektoplasmatischen Wände der Flüssigkeitsvakuolen konfluieren und der Flüssigkeitsinhalt nach außen abgegeben oder etwa resorbiert wird, entzieht sich zunächst noch der direkten Beobachtung.

Parallel mit der „Einschmelzung“ der Ektoplasmastrukturen in der Berührungszone muß eine Vereinigung unveränderter Flüssigkeitsvakuolen — nicht Verschmelzung unter Zusammenfließen der Alveoleninhalte! — auf einem Teil der Kugeloberfläche vor sich gehen. Um diesen Vorgang zu verstehen, ist es erforderlich, sich von der üblichen Vorstellung in optischen Schnitten frei zu machen. Sobald nämlich die „Entoplasma-kugeln“ der beiden Partner nach der strukturellen Umformung der ektoplasmatischen Kontaktzone in direkte Berührung gekommen sind und ihre — leichter zu verstehende — Verschmelzung eingeleitet ist, muß der Umgestaltungsvorgang im Ektoplasma eingestellt werden und eine neue Verbindung des Ektoplasma der beiden Partner auf einer sich langsam vergrößernden Kreiszone stattfinden.

Dieser mikrodynamisch recht verwickelte Vorgang der neuen „Verlötung“ der „Rindenschicht“ in der Region der „Vereinigungsfurche“ ist nicht mehr Ab-, sondern Aufbau!

Das Zeitrafferlaufbild lehrt, daß der Vorgang der Plasmogamie mit völlig gleichbleibender Geschwindigkeit abläuft; keinerlei Rhythmus wird in der Bewegung der beiden Partner erkennbar. Die Dynamik des Vorganges ähnelt sehr dem von uns an vielen Objekten unter Änderung des Zeitmomentes nachgewiesenen aktiven Aneinanderpressen der Blastomere nach einem Teilungsschritt beim sich furchenden Ei. Hier wie dort verschwindet die Furche, bei der Plasmogamie vollkommen, bei der Furchung meist nur zum Teil. (Bei der Bernsteinschnecke *Succinea putris* z. B. sieht das Zweizellenstadium fast kugelig aus; beim Ei der weißen Maus ist sogar das 8- und 16-Zellen-Stadium völlig abgerundet und im Leben kaum als vielzellig zu erkennen, ein Verhalten, das sich mikrodynamisch — mit der nötigen Einschränkung — mit der Plasmogamie mehrerer *Actinosphaerien* in Parallele setzen läßt.

Osogoe (1941) hemmte durch mechanische Eingriffe oder durch KCl oder NaCl eine im Gange befindliche Teilung und brachte die Tochtertiere wieder zur vollständigen Verschmelzung, sogar wenn das Auseinanderweichen bereits fast beendet war. Nach Aufhören der Eingriffe geht die Teilung in normaler Weise zu Ende.  $\text{CaCl}_2$  und  $\text{MgCl}_2$  sind ohne Wirkung; Chloralhydrat und Äther verursachen eine irreversible Wiedervereinigung der Tochtertiere. Bei Chemikalien, die eine Um-

kehr des Vorganges bewirken, soll zunächst eine Verflüssigung des Ektoplasma eintreten.

Auch bei dieser Untersuchung ist schwer zu beurteilen, ob es sich um eine wirkliche Teilung oder um eine Trennung nach einer früheren Plasmogamie handelt.

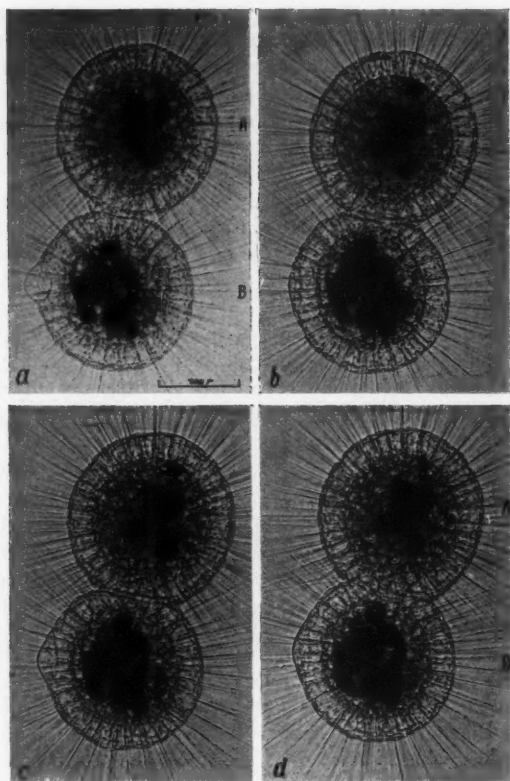
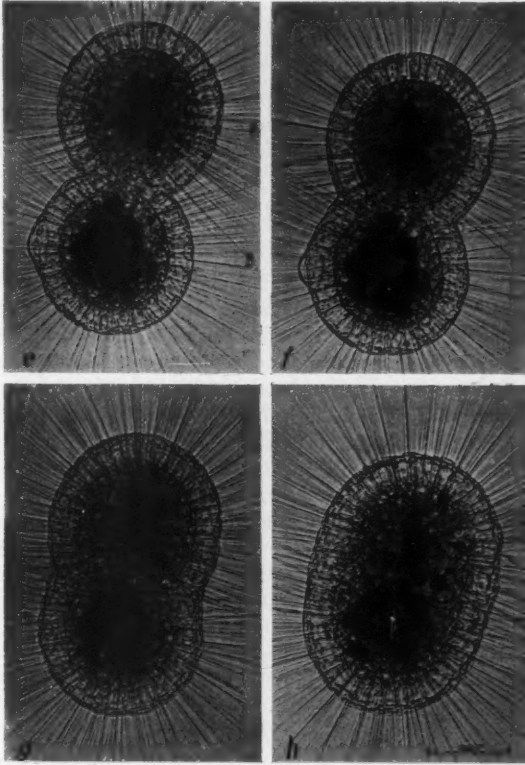


Abb. 3 (Einstellung 52). Normale Plasmogamie von nahezu gleich großen *Actinosphaerien*. Ein Nahrungsobjekt ist nicht in der Nähe. a: Berührung von A und B. b: Berührungszone verbreitert; ungestörte Anordnung der Axopodien. c: Engere Verbindung der Partner durch in den Solzustand übergeführte Axopodien. d: Ektoplasmaalveolen in der mittleren Zone der Verschmelzung „aufgelöst“.

Für die Dynamik des Vorganges — unter Zeitraffung beobachtet — spielt diese Frage vorläufig so lange keine Rolle, bis die feineren Unterschiede zwischen einer echten Teilung und einer auf eine ein- oder mehrfache Plasmogamie in sehr variablen Zeitabständen folgende Wiedertrennung am lebenden Objekt festgestellt werden können. Die einer

Teilung vorausgehenden Vorgänge an den Kernen sind ja bei *Actinosphaerium* im Leben nicht zu beobachten. Daher ist für die vorliegende bewegungsphysiologische Untersuchung der neutrale Ausdruck Trennung beizubehalten, wenn auch u. U. einmal die sicher viel seltenere echte Teilung vorlag.



Entoplasma von A und B stehen in Verbindung. e: In der „Vereinigungsfurche“ ist das Ektoplasma von A und B in Verbindung. f: Allmähliches Verstreichen der „Furche“ zwischen A und B. Entoplasmaverbindung ist breiter geworden. g: „Verschmelzung“ fast beendet. h: Ellipsoidische Gestalt des Doppeltieres erreicht. Teilstrich = 0,1 mm. Zeitangaben zwischen den Phasen der Verschmelzung im Text.

Soweit die allgemeine Betrachtung über die einleitenden Vorgänge bei der Plasmogamie von zwei *Actinosphaerien*. Es folgt eine Darstellung der wirklich zu beobachtenden Tatsachen an Hand von Teilbildern aus Mikrozeitraffer-Filmaufnahmen.

## Einstellung 52 (Abb. 3, a—h).

Es befanden sich etwa 20 Tiere im Präparat; vier Plasmogamien wurden gleichzeitig eingeleitet. (Die Tiere wurden frisch dem Zuchtquarium entnommen, in filtriertem Wasser des gleichen Beckens gewaschen und in filtriertem Aquariumswasser unter dem Deckglas bis zur Erreichung der ovalen Form unter Zeitraffung [42fache Geschwindigkeit im Laufbild] aufgenommen.)

*A* hat einen Durchmesser von  $200\ \mu$  und eine Dicke des Ektoplasma von  $27\ \mu$ . Die gleichen Maße für *B* betragen: Durchmesser:  $188\ \mu$ ; *E*:  $31\ \mu$ . Die annähernd gleichen Maße lassen den Schluß zu, daß sich die beiden Partner offenbar in ähnlicher Phase befinden. *B* weist wesentlich mehr Nahrungsvakuolen auf als *A*.

In Abb. 3, a berühren sich *A* und *B* bereits; in der Berührungszone finden sich keine gebogenen Axopodien, woraus geschlossen werden kann, daß eine Plasmogamie zustande kommen wird. Die Grenze Ektoplasma ist bei beiden Partnern in der Berührungszone erheblich undeutlicher als in den übrigen Regionen, was ebenfalls auf eine baldige Verschmelzung hinweist. *B* zeigt eine leichte Eindellung in der Berührungszone, die nun allmählich breiter wird. *A* füllt die Eindellung in *B* enger aus. 4<sup>m</sup> seit a (Abb. 3, b) ist die Berührung bereits  $80\ \mu$  breit. Die Eindellung von *B* ist zu einer leicht konkaven Abflachung ausgeglichen, in die sich *A* einschmiegt. Die Axopodien außerhalb der Berührungszone haben ihre normale radiäre Einstellung beibehalten. Die verflüssigten Axopodien der direkten Kontaktzone sind infolge der bereits sehr engen Berührung der Tiere nicht der Beobachtung zugänglich. Sie bilden eine lebende „Kittmasse“ zwischen *A* und *B*. Das Zeitrafferlaufbild lehrt, daß diese dünne, hier nur  $5\ \mu$  messende Schicht von lebendem Cytoplasma lebhaft, hin und her wogende Bewegungen ausführt. Diese sind der Grund für die Tatsache, daß die schmale Zone nicht so scharf abgebildet wird wie die Umgebung. Abb. 3, b läßt ferner noch bei *A* erkennen, daß dunkleres granuliertes Entoplasma in die offensichtlich bereits in Umformung befindliche grobalveoläre Ektoplasmazone in der Kontaktzone übertritt. Der Partner *B* zeigt aufs deutlichste, daß sein Entoplasma einen breiten „lobosen“ Fortsatz bis zur Berührungsgrenze vorstreckt, ein Vorgang, der schon etwa 2<sup>m</sup> vorher beginnt. Eine Minute später als Teilbild b weist die Entoplasmavorwölbung in *B* keinen scharfen Kontur mehr auf; in der ektoplasmatischen Umbildungszone treten die ersten Andeutungen streifiger Strukturen auf, die von der Mitte der nunmehr sehr schmalen Kontaktzone bis in das Entoplasma von *A* und *B* hineinreichen.

In Teilbild c der Abb. 3 (5½<sup>m</sup> seit a) ist jetzt eine helle Zone von  $5\ \mu$  Breite erkennbar, was nicht bedeutet, daß etwa der enge Kontakt der Partner um diesen kleinen Betrag gelockert ist, denn man sieht noch immer die erwähnten streifigen Strukturen, von Entoplasma zu Entoplasma reichend. Der Eindruck eines scheinbar gelockerten Kontaktes zwischen *A* und *B* wird durch die bereits geschilderten (unter Zeitraffung) sehr lebhaften Bewegungen des aus „eingeschmolzenen“ Axopodien gebildeten „Kittplasma“ hervorgerufen. Im Zeitrafferlaufbild sind die durch die Bewegungen dieses Plasma bewirkten kleinen Näherungen und Entfernungen (um den Betrag weniger  $\mu$ ) der Partner *A* und *B* sehr instruktiv. 1<sup>m</sup> später ist die Ver-

bindung der Entoplasmakugeln von *A* und *B* einwandfrei in einer Breite von  $32\mu$  eingetreten. Teilbild *d* ist 7<sup>m</sup> später als *a* aufgenommen; sehr deutlich sieht man die jetzt  $32\mu$  breite Verbindung der Entoplasmen von *A* und *B*.

Auf dem Grund der Vereinigungsfurche beobachtet man nunmehr, besonders klar links, daß die Ektoplasmakonturen von *A* und *B* ineinander übergehen, was bedeutet, daß auch hier die Vereinigung vollzogen ist. Rechts gehen zwar auch schon die Außenbegrenzungen des Ektoplasma von *A* und *B* ineinander über, es ist jedoch — neben der entoplasmatischen Verbindung — immer noch der kleine,  $5\mu$  breite scheinbare „Spaltraum“ zwischen den Partnern zu sehen.

Wesentlich ist demnach, daß die Vereinigung von Ekto- und Entoplasma fast gleichzeitig erfolgt! Ohne Zweifel bereitet die Ektoplasma-Umformung in der Tiefe der „Furche“ erheblich größere Schwierigkeiten als die Herstellung der Verbindungsbrücke zwischen den Entoplasmakugeln; Viskosität — soweit dieser physikalische Begriff für Eigenschaften des lebenden Cytoplasma überhaupt nach den neueren Anschauungen angewandt werden kann — und Struktur des Entoplasma sind offenbar wesentlich geeigneter zur Ausführung von Verschmelzungsvorgängen als das grobvakuolisierte Ektoplasma, bei dem erst der „Widerstand“ jeder Flüssigkeitsalveole einzeln überwunden werden muß.

30<sup>s</sup> nach Teilbild *d*, Abb. 3, ist der entoplasmatische Verbindungsstrang  $37\mu$  breit geworden bei einer Gesamtbreite der Verschmelzungszone von  $108\mu$ . Die Ektoplasmakonturen im rechten Furchengrunde gehen jetzt auch ineinander über. In der kreisförmigen „Verlötungszone“ des Ektoplasma — rechts und links vom entoplasmatischen Verbindungsstrang — deuten leichte Unschärfen in der Photographie die im Zeitrafferlaufbild sichtbar werdenden lebhaften Bewegungen an, die in dieser strukturellen „Aufbauzone“ stattfinden. Weitere 30<sup>s</sup> später, insgesamt 8<sup>m</sup> seit Teilbild *a*, ist die Verschmelzung auf einer Phase, die Teilbild *e*, Abb. 3, wiedergibt. Bei einer Breite der Verschmelzungszone von  $116\mu$  weist die Entoplasmabrücke jetzt nahezu die gleiche Struktur auf wie das übrige Entoplasma. Die ektoplasmatische „Verlötungszone“ von *A* und *B*, in der nächsten Umgebung des Furchengrundes, befindet sich, trotz der erfolgten Vereinigung — oder Verschmelzung — noch in Umformungsunruhe, kenntlich an der Unschärfe. Diese Unruhe dauert bis zur 11. Minute nach Teilbild *a* an. Erst 14<sup>m</sup> nach *a* werden im Ektoplasma im Grunde der Vereinigungsfurche die ersten „umgeformten“ Wände der umgeordneten Flüssigkeitsvakuolen sichtbar (Teilbild *f* der Abb. 3). In Teilbild *g* ist die Verschmelzungszone  $191\mu$  breit bei einer Gesamtlänge von *A* + *B* von  $345\mu$ ; 25<sup>m</sup> sind seit Teilbild *a* verstrichen. Teilbild *h* wurde 50<sup>m</sup> später als *a* aufgenommen. Bei einer Gesamtlänge von *A* + *B* von  $319\mu$  und einer größten Breite von  $231\mu$  ist die ellipsoide Gestalt erreicht. Eine Durchmischung der nunmehr zu einem Ellipsoid vereinigten früheren Entoplasmakugeln hat, wie aus der Anordnung der Nahrungsvakuolen und aus dem Zeitrafferlaufbild einwandfrei hervorgeht, noch nicht stattgefunden!







Man könnte sich durchaus vorstellen, daß die Plasmogamie in den ersten Phasen wesentlich langsamer verläuft, etwa bis zu dem Zeitpunkt der Herstellung der Verbindung der beiden Entoplasmakugeln, und dann nach beendeter „Verlötung“ der Ektoplasmaschicht in der nunmehr ringförmigen Zone der Vereinigung schneller, wenn es sich nur noch darum handelt, die Kugelform des Verschmelzungsproduktes herzustellen. In Abb. 4 sind 24 Phasen der Plasmogamie der Einstellung 52 nach Teilbildmessungen aufgezeichnet. Der Wert für die Länge  $L$  des Doppelpartners  $A + B$  nimmt um 20% ab; die Breite  $B$  in der Verschmelzungszone vergrößert sich um 78%. Der ruhige Verlauf der beiden Kurven zeigt, daß keinerlei Rhythmus des Geschehens vorliegt, etwa ein temporäres Aneinanderpressen, verbunden mit Verkürzung und darauffolgende Streckung.  $L$  und  $B$  sind gegenläufig; auf den zu verschiedenen Zeiten errichteten Ordinaten ist jeweils das Verhältnis von  $L:B$  abzulesen. Die Kurve  $L:B$  zeigt das Abfallen der Werte für diesen Quotienten, erheblich während der ersten 15<sup>m</sup>, geringfügig von diesem Zeitpunkt ab bis zum Ende der Beobachtung.

Die Mehrzahl der plasmatischen Wände der Flüssigkeitsvakuolen im Ektoplasma ist radial gerichtet; die Axopodien sind mit ihren proximalen Teilen zwischen den radiären plasmatischen Vakuolenwänden verankert und reichen bis in das Entoplasma. Werden Flüssigkeitsvakuolen aus ihrer Lage verschoben, so werden die relativ starren, jedoch elastischen Axopodien mitgenommen. Ihre langen „Hebelarme“ der distalen freien Anteile zeigen die kleinen Verlagerungen der Vakuolenwände stark vergrößert an, sie wirken demnach als Zeiger mikrodynamischer Vorgänge.

Bei der genauen Analyse der Defäkation (W. Kuhl 1951, Einstellung 46; Abb. 22, Teilbild e und f) trat dies bereits deutlich in Erscheinung, als durch aus ihrer Lage durch die Nahrungsvakuole verdrängte Flüssigkeitsvakuolen die Axopodien ebenfalls aus ihrer Lage brachten. Bei der Plasmogamie wird die zeigerartige Verstellung der Axopodien noch deutlicher sichtbar, und zwar sobald die Verbreiterung der Verschmelzungszone einsetzt, die aus der Berührungszone infolge aktiver Tätigkeit der Partner  $A$  und  $B$  hervorging. In Abb. 4 stellt die punktierte Kurve  $W$ , die einen ähnlichen Verlauf wie  $L:B$  nimmt, die Abnahme der Winkelgröße zwischen den Axopodien in der Nähe der Vereinigungsfurche dar. Diese Winkel werden immer spitzer, je mehr die Kontaktzone zwischen  $A$  und  $B$  an Breite zunimmt (s. a. Abb. 3, a–h und das Schema Abb. 5, a–c).

Abb. 5 gibt in schematischer Weise eine Vorstellung von den drei Hauptphasen einer Plasmogamie von zwei Partnern, gezeichnet nach drei Teilbildern der Abb. 5.

a) Berührung der Partner; erste Verbindung durch eingeschmolzenes Axopodienplasma (in lebhafter Bewegung unter Zeitraffung; eng punktiert). Die sich gegenüber liegenden Ektoplasmaazonen (punktiert) müssen „eingeschmolzen“ werden, ehe die kugeligen Entoplasmamassen sich vereinigen können. Vermutlich wird der Reiz zu dieser lokalisierten Überführung in ein dünnflüssigeres Plasma durch das „Kittplasma“ der eingezogenen Axopodien geliefert.

b) Die Entoplasmaanteile von *A* und *B* sind vereinigt. Im Grunde der allmählich verstreichenden „Vereinigungsfurche“ ist die ringförmig vorzustellende Region der sich neu vereinigenden Ektoplasmaschichten von *A* und *B* im wie üblich dargestellten optischen Schnitt durch eine Anordnung der Flüssigkeitsvakuolen in keilförmiger Gestalt gekenn-

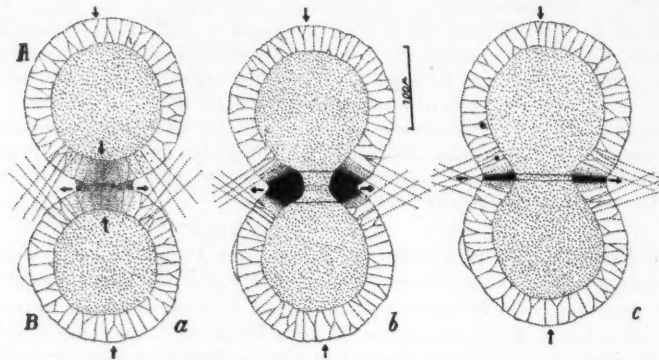


Abb. 5. Schema der Hauptphasen der Plasmogamie der Einstellung 52, Abb. 5 (a entspricht Teilbild a; b Teilbild d; c Teilbild f).

a: Kurz nach Berührung der Partner; dunkel punktiert das aus eingeschmolzenen Axopodien hervorgegangene „Kittplasma“ in der Berührungszone. Heller punktiert die nach Verbreiterung der Berührungszone „eingeschmolzenen“ Ektoplasmaanteile. Die Überführung der plasmatischen Wände der Flüssigkeitsalveolen in der hell punktierten Zone in flüssigen Zustand ermöglicht erst die in b dargestellte Vereinigung der Entoplasmaanteile der Partner.

b: 7<sup>m</sup> später als a. Verbindung des Entoplasma vollzogen (locker punktiert). Tief-schwarz verlaufend: Ringförmige Zone im Grunde der Vereinigungsfurche, innerhalb der eine Umordnung und spätere „Verlötung“ der Ektoplasmaanteile der Partner stattfindet.

In c (14<sup>m</sup> seit a) ist in der ektoplasmatischen Ringzone die normale Ruhestuktur des Ektoplasma (Alveolarstruktur) fast völlig wiederhergestellt. Nur im Grunde der fast verstrichenen „Vereinigungsfurche“ deutet eine schmale schwarze Zone noch die letzte Phase der Um- und Neuordnung der Ektoplasmastruktur zwischen den Partnern an. Es sind nur wenige Axopodien in der Vereinigungszone gezeichnet zur Erläuterung der Winkeländerung zwischen ihnen während der Plasmogamie (s. Abb. 4, punktierte Kurve). Bewegungsrichtungen durch Pfeile angegeben.

Teilstrich = 0,1 mm.

zeichnet. Körperlich vorgestellt liegt ein Ektoplasma-Ring vor, der innen dicker als außen ist. Bei der Verkürzung der Gesamtlänge von  $A + B$ , durch Vereinigung der Entoplasmaanteile z. T. mitbedingt, wird dieser Ektoplasmaring nebst den benachbarten Regionen zunächst bis zum größten Durchmesser der Partner von innen nach außen gedehnt bis zur Erreichung des Ellipsoids (Abb. 5, Teilbild h) und weiter sogar der Kugel des neu-entstandenen Doppeltieres.

Die ringförmige „Verlötungszone“, in der sich, cytologisch betrachtet, die Ektoplasmastrukturen von *A* und *B* um- und neubilden, ist im Zeitrafferlaufbild ebenfalls durch Bewegungen des offenbar zunächst im Grade der „Gelatinisierung“ herabgesetzten Plasma charakterisiert. Teilbilder zeigen daher Unschärfe in dieser Region. Die Breite des schwarz gezeichneten Teiles von *b* gibt ungefähr die Ausdehnung der in Mitleiden-schaft gezogenen Ektoplasmaanteile des „Ringes“ an.

c) Die Neubildung von alveolärem Ektoplasma in der ringförmigen „Verlötungszone“ ist nahezu beendet (schmale schwarze Zone).

#### Zusammenfassung über die normale Plasmogamie von zwei Partnern

Plasmogamien waren bei unserem Material sowohl im Zuchtaquarium wie auch *in vitro* niemals „Freßgemeinschaften“ zur Bewältigung besonders großer Beuteobjekte, wie im Schrifttum angegeben. Bei unbeeinflusster Plasmogamie, d. h. ohne die Tiere durch experimentellen Eingriff in größere Nähe oder gar direkt in Kontakt zu bringen, war — äußerlich betrachtet — zunächst keine erkennbare Ursache zu diesem Verhalten gegeben. Beuteobjekte waren nie in der Nähe. Aus dem Verhalten der Axopodien bei beginnender Annäherung kann mit Sicherheit geschlossen werden, ob eine Plasmogamie zustande kommen wird oder nicht. Im Falle einer Verschmelzung bleiben die Axopodien völlig gerade und radiär eingestellt. Tritt keine Vereinigung ein, so sieht man eine Reihe von Axopodien gebogen. Die Tiere streifen dann aneinander vorbei, wodurch die Verbiegung zustande kommt, wenn nämlich die distalen Enden auf Widerstand stoßen.

Es lassen sich drei Hauptphasen bei der Plasmogamie unterscheiden. 1. „Einschmelzen“ der Axopodien in der Kontaktzone zu einer aktiv beweglichen, wenige Mikron dicken, lebenden, ersten Verbindung der Partner. Es folgt die Überführung des Ektoplasma in der Berührungszone in dünnflüssigeren Zustand, da die grobvakuolierte Rindenstruktur eine Vereinigung des Entoplasma von *A* und *B* nicht zuläßt. 2. Nach dieser Umbildung des Ektoplasma kommt die Verschmelzung der Entoplasmaanteile zustande, zunächst in Gestalt eines nur schmalen Verbindungsstranges. 3. In der „Vereinigungsfurche“ wird in der ringförmigen Berührungszone eine innige Verbindung der grobvakuolierten Ektoplasmaanteile von *A* und *B* hergestellt. Eine teilweise Einschmelzung, Umordnung und Neubildung von Wänden der Flüssigkeitsalveolen ist bei diesem Vorgang erforderlich. Während der Ausbildung dieser Verbindung läßt der Zeitrafferfilm Bewegungen in der ringförmigen Zone erkennen.

Einige Zeitangaben: 4<sup>m</sup> nach Beobachtungsbeginn ist die Ektoplasma-verflüssigung in der Kontaktzone bereits so weit vorgeschritten, daß das Entoplasma des einen Partners einen breiten, lobosen Fortsatz dem Entoplasma des anderen entgegenstrecken kann. 7<sup>m</sup> seit Beginn der Zeitrafferfilm-Aufnahme ist eine 32  $\mu$  breite entoplasmatische Verbindungsbrücke zwischen *A* und *B* hergestellt; im Grunde der Vereinigungsfurche gehen

die Außenkonture des Ektoplasma ineinander über. Nach der „Verlötung“ in der ektoplasmatischen Ringzone wird die Berührungsregion kontinuierlich verbreitert unter starker Dehnung der Ringzone der Rindenschicht.

Der von den Axopodien in der Nähe der Vereinigungszone gebildete Winkel ist ein Maßstab für die Verbreiterung des neuen Doppeltieres und das allmähliche Verstreichen der Vereinigungsfurche. 50<sup>m</sup> nach Beobachtungsbeginn ist eine ellipsoide Gestalt des neugebildeten Doppeltieres hergestellt.

Daß eine Plasmogamie auch bei zunächst schwer deutbaren Strukturverhältnissen des einen Partners zustande kommen kann, beweist Einstellung 48, von der vier Teilbilder als Beleg in Abb. 6, a—d gegeben werden. Wie aus der Vorgeschichte hervorgeht, hat A 1<sup>h</sup> 20<sup>m</sup> vor Aufnahmebeginn eine Plasmogamie mit einem Partner durchgeführt, der sich offenbar im Stadium der Rückbildung befand, kenntlich an dem sehr dunklen, dichten und völlig undurchsichtigen Entoplasma und besonders stark grobvakuolisierten Ektoplasma. Die Grenzen zwischen diesen ehemaligen Partnern, die A zusammensetzen, sind in Teilbild a noch deutlich zu erkennen, und zwar an der dunklen, undurchsichtigen Entoplasmazone.

Der Anlaß zur Zeitrafferfilm-Aufnahme war die merkwürdige, auf der rechten Seite von A gelegene „Aufblähung“ des Ektoplasma, im folgenden kurz als „Blase“ bezeichnet. Sie wurde  $\frac{1}{2}^h$  vor Aufnahmebeginn subjektiv beobachtet. Die „Blase“ umfaßte zu dieser Zeit nahezu die Hälfte des peripheren Umfanges von A und zeigte verschiedene Höhe, im Durchschnitt 46  $\mu$  (Abb. 6, a). Im Laufe dieser 30<sup>m</sup> „konzentrierte“ sich das „gedunsene“ Ektoplasma zu einer einheitlichen, 69  $\mu$  hohen Vorwölbung, die etwa ein Viertel der Peripherie einnahm. Zu Aufnahmebeginn liegt der neue Partner B bereits  $\frac{1}{2}^h$  am unteren Ende der „Blase“. Gerade gestreckte Axopodien bei beiden Tieren gestatten die Voraussage, daß eine Plasmogamie trotz der großen Verschiedenheit der beteiligten Tiere erfolgen wird.

Abb. 6, a gibt eine Vorstellung von Habitus und Lage der Partner. A hat einen Durchmesser von 220  $\mu$ , B von 160  $\mu$ . Vom „Blasenektoplasma“ erheben sich nur sehr kleine, wirr durcheinander stehende Axopodien. Außerhalb der „Blase“ weist A durchaus normale Axopodien auf. Es besteht kein Zweifel, daß die Blasenwand unter erheblichem Binnendruck steht; das benachbarte Ektoplasma, vor allem im Bilde unten, neben der „Blase“, ist stark erniedrigt: die Flüssigkeitsvakuolen sind aus ihrer normalen Lage gezerrt; vielleicht sind dabei Plasmawandungen zerrissen und die „Blase“ hat den mehr oder weniger flüssigen Inhalt aufgenommen. Die genaue Lage der „Blase“ zum Partner B läßt sich auf dem optischen Schnitt nicht genau feststellen (häufiges Fokussieren ist bei Mikrozeitraffer-Filmaufnahmen unzweckmäßig!). Da bei beiden Partnern der größte Durchmesser der kugeligen *Actinosphaerien* abgebildet ist, kann die „Blase“ weder auf noch unter B liegen; sie scheint B eingedrückt zu haben.

Abb. 6, b, 8<sup>m</sup> 42<sup>s</sup> später als a, läßt erkennen, daß die Abkuglung der „Blase“ weiter zugenommen hat; sie mißt jetzt 158  $\times$  60  $\mu$ . Trotz Aus-

bildung der „Riesenblase“ hat der Plasmogamievorgang deutliche Fortschritte gemacht. Die mit  $\times$  bezeichnete Stelle zeigt klar, daß das „Blasenektoplasma“ mit dem Ektoplasma von *B* Verbindung eingegangen ist. An dieser Stelle sind auch keine kurzen Axopodien vorhanden wie oben auf der „Blase“. *B* weist ungewöhnlich lange Axopodien auf. In *A* reicht die „Blase“ bis zum dichten Entoplasma, das von der ersten Plasmogamie her stammt, aus der das Doppeltier *A* hervorging.

Bei der Zeitrafferfilm-Aufnahme dieses Objektes ließ sich natürlich das Endgeschehen, eine völlig durchgeführte Plasmogamie, nicht absolut sicher, sondern höchstens auf Grund des anfänglichen Verhaltens der Axopodien vorsehen, da vorher und auch späterhin nie eine derartige auffallende Strukturänderung des Ektoplasma beobachtet wurde. In Abb. 6, *b* (44<sup>m</sup> seit Aufnahmebeginn) mußte man den Habitus von *A* doch als mehr oder weniger pathologisch ansehen; es wurde daher eine Beobachtungspause eingelegt (von 4<sup>m</sup>). In dieser Zeit wurde der größte Teil des Blaseninhaltes offenbar nach außen entleert, denn die „Blase“ mißt nach der Pause nur noch  $60 \times 70 \mu$ .

Teilbild *c* zeigt die Partner 13,5<sup>m</sup> nach der Pause. Infolge des — einer Schrumpfung ähnlichen — Zusammensinkens der „Blasenwand“ haben Dislokationen einzelner ektoplastischer Flüssigkeitsalveolen stattgefunden, die oben deutlich zu sehen sind. Vier kurze Axopodien stehen rechts und links von einer abgekugelten,  $20 \mu$  messenden, aus dem Verbände gedrängten Flüssigkeitsvakuole. Die Plasmogamie von *A* und *B* ist nunmehr in völlig normaler Weise im Gange. 18<sup>m</sup> nach Teilbild *c* deuten nur noch zwei bis drei Flüssigkeitsalveolen, als Resterscheinung der Störung der Ektoplasmastruktur durch die „Blasenbildung“, die vorausgegangenen Vorgänge an. Die in der Vereinigungsfurche liegenden abgekugelten Alveolen lassen immer noch vier bis sechs kurze Axopodien ausstrahlen. Zu dieser Zeit nähert sich *A* ein weiteres mittelgroßes *Actinosphaerium*. Die Axopodien streifen aneinander vorbei und werden abgebogen: ein Anzeichen, daß keine Plasmogamie erfolgen wird. Dieses dritte Tier bleibt sehr lange in der Nähe von *A* und *B*. Auf Teilbild *d*, Abb. 6, ist es links oben noch zu erkennen. Das „phobische“ Verhalten der Axopodien von *A* + *B* ist hier besonders charakteristisch: stark mechanisch abgebogene Spitzen der Axopodien; zwei Axopodien sind rechtwinklig abgeknickt bei sonst normaler, radiärer Stellung proximad der Knickstelle. Bei dieser rechtwinkligen Abknickung ist wohl anzunehmen, daß infolge der zuerst rein mechanischen Verbiegung von einem gewissen Betrag ab die Elastizitätsgrenze des Axopods überschritten wird und eine geringfügige Verflüssigung des elastischen „Achsenstabes“ an der Stelle der größten Beanspruchung eintritt. Wie das darunterliegende Axopod erkennen läßt, wird bei der florettklingenähnlichen Biegung das ganze Axopod etwas aus der radiären Lage gebracht. Bei der zur rechtwinkligen Knickung führenden Beanspruchung geht der distale Teil des Axopods wieder dank der Elastizität des Achsenfadens in die radiäre Lage zurück. Der aus einigen Flüssigkeitsalveolen bestehende Rest des „Blasenektoplasma“ (Teilbild *c*)



ist unterdessen von der Rindenschicht des Doppeltieres aufgenommen worden. Seit Teilbild a sind 1<sup>h</sup> 29<sup>m</sup> vergangen. Die Abrundung des Doppeltieres — Dreifachtieres, wenn man die vorausgegangene Plasmogamie von A mitrechnet — ist fast beendet. Die dunkle Entoplasmazone des früheren

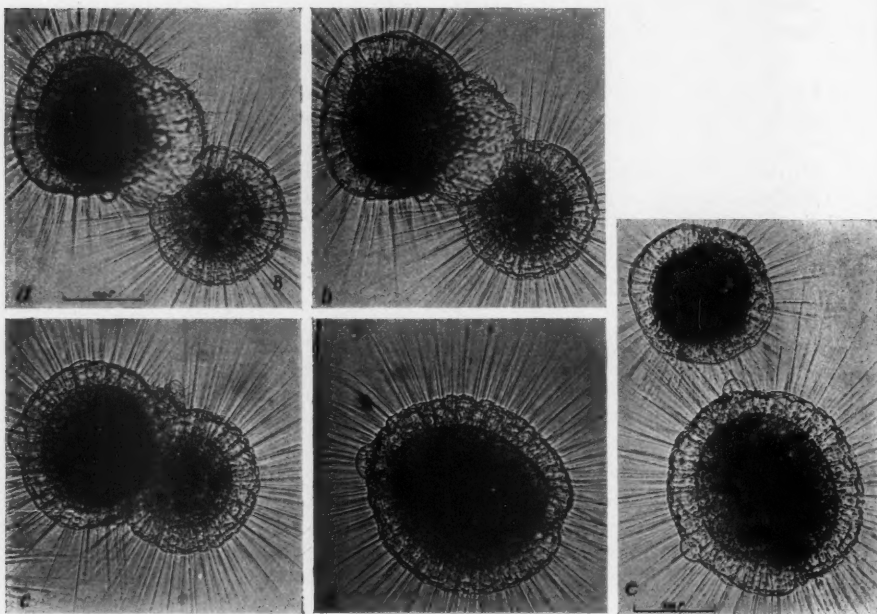


Abb. 6 (Einstellung 48). Plasmogamie bei eigenartig lokalisiert „aufgeblähtem“ Ektoplasma des Partners A: Ektoplasmatische „Riesenblase“. A besteht bereits aus zwei verschmolzenen Tieren (dunkle Entoplasmaregion vom ehemaligen Partner herrührend). Zwischen b und c wurde während einer Aufnahme-pause die „Blase“ nach außen entleert, der Rest heilt ein (c). d: Verschmelzung fast beendet. e: Im abgekugelten Doppel- bzw. Dreifachtier „Individualgrenzen“ noch erkennbar. Phobisches Verhalten gegenüber einem sich nähernden neuen „Partner“ (an den Berührungstellen der Axopodien „Verschmelzungsknötchen“). Teilstrich = 0,1 mm. Zeitangaben im Text.

Partners von A liegt jetzt in der Mitte, ein deutlicher Beweis, daß die Vermischung der Entoplasmaanteile der Partner nur sehr langsam vollzogen wird und die „Pseudoindividualität“ innerhalb gewisser Grenzen sehr lange erhalten bleibt. 60<sup>m</sup> 6<sup>s</sup> später als d hat sich dem gut abgekugelten Aggregat oben ein *Actinosphaerium* von 172  $\mu$  Durchmesser bis auf 37  $\mu$  genähert. Die Axopodien der beiden Tiere zeigen ein bemerkenswertes Verhalten, das nur noch einmal in allerdings schwächerer Ausbildung beobachtet wurde.



An den Stellen der Überkreuzung der Axopodien scheint in diesem Falle eine direkte Berührung zustande gekommen zu sein, verbunden mit einer lokalen Einschmelzung im Bereiche von etwa  $2\mu$ , und zwar in Knotenform. Diese kleinen Verdickungen liegen — entsprechend der

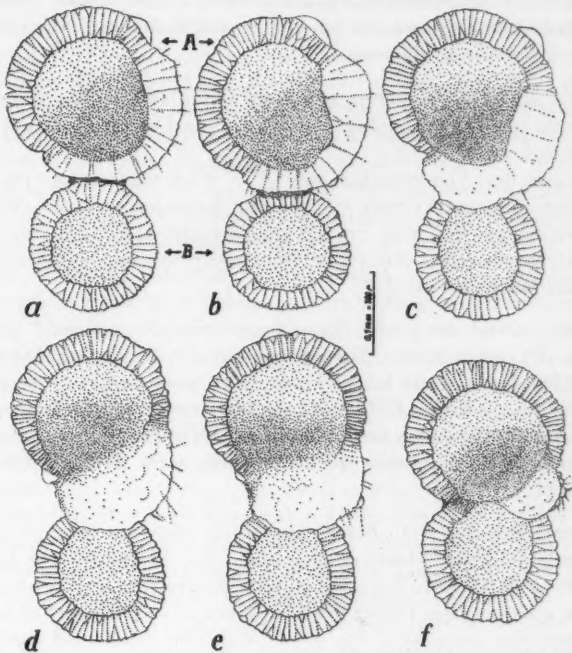


Abb. 7. Ergänzung zu Abb. 6. Vereinfachte Darstellung der Veränderung der ektoplasmatischen „Blase“ im Laufe von 43<sup>m</sup> 42<sup>s</sup>. a: Beginn der Plasmogamie zwischen A und B. Erläuterung im Text. Durch Teilbildanalyse aus dem Zeitrafferfilm (Einstellung 48) gewonnen. Axopodien nur an der „Blase“ eingezeichnet, Nahrungsvakuolen nicht dargestellt. Zwischen e und f erfolgte die „Entleerung der Blase“. Teilstrich = 0,1 mm.

Lage der Axopodien — in verschiedenen Ebenen und erscheinen daher bald heller, bald dunkler als die Umgebung. Abb. 6, e läßt auf Grund des Verhaltens der Axopodien keine Voraussage zu, was geschehen wird, ob eine Plasmogamie eintritt, eine „temporäre Brückenbildung“ (Einstellung 45 und 50, Abb. 11, 12, 13) oder ein Aneinander-Vorbeistreichen („Phobie“). Die Tiere kommen später nicht in Berührung. Übrigens erscheint das Ektoplasma des oberen kleineren Tieres strukturell leicht gestört. Die Knotenbildung läßt sich nicht als sicheres Erkennungszeichen für das weitere Verhalten der Partner verwenden. Sie ist als lokale Einschmelzung an gekreuzten Axopodien aufzufassen und kommt offenbar zustande, wenn die Annäherung relativ heftig erfolgt: mechanischer Reiz.

Im Rahmen dieser Untersuchung konnte lediglich das mikrodynamische Verhalten der nur einmal beobachteten „blasenförmigen“ Ektoplasmastruktur unter Zeitraffung ermittelt werden. An einem Objekt — ohne Versuche — lassen sich kaum völlig sichere Aussagen über die Ursachen der Entstehung einer derartigen ektoplastischen „Aufblähung“ machen. Es ergeben sich folgende Fragen, die mit einem verschiedenen Grade von Sicherheit beantwortet werden können.

1. Ist die mächtige Ausdehnung einiger ektoplastischer Flüssigkeitsvakuolen eine zwar seltene, aber doch normale Lebensphase, oder ist sie als pathologisch anzusehen?

Auf Grund der Vorgeschichte von *A* — Plasmogamie mit in Rückbildung befindlichem Partner — und der Tatsache, daß die „Blasenbildung“ reversibel ist und zum Schluß ein normales „Dreifachtier“ vorliegt, kann höchstens von einer Störung, aber nicht von einem pathologischen Vorgang gesprochen werden.

2. Woher stammt die große Flüssigkeitsmenge der „Blase“? Auf einer Insuffizienz der kontraktiven Vakuolen kann die streng lokalisiert angesammelte Flüssigkeit nicht beruhen, da noch mindestens zwei normal funktionierende kontraktile Vakuolen vorhanden sind. Die angestaute Flüssigkeit stammt von dem früheren, in Rückbildung begriffenen Plasmogamiepartner von *A*, und zwar von seinem sehr stark vakuolisierten Ektoplasma.

3. Ist der Hohlraum der „Blase“ einheitlich oder durchziehen ihn noch einzelne stark gedehnte Wände ektoplastischer Alveolen? Auf Teilbild 1 der Einstellung 48 (in Abb. 7, *a* schematisiert dargestellt) ist das aufgeblähte Ektoplasma noch über die Hälfte des Umfanges von *A* ausgedehnt mit einer Maximalhöhe von etwa  $50\mu$ . An dieser dicksten Stelle sind noch einige Alveolenwände, vorwiegend radiär eingestellt, erkennbar; die wenigen Axopodien sind sehr kurz. In Teilbild *a* (Abb. 6) hat die „Blase“ eine Dicke von  $60\mu$ ; vermutlich werden sich an den niedrigeren Stellen noch einige radiäre Plasmawände trotz der sehr starken Dehnungsbeanspruchung vorfinden. Wahrscheinlich setzt sich die „Blase“ nur noch aus einigen wenigen „Riesenalveolen“ zusammen.

4. Wie weit reicht die „Blase“ nach innen? In Abb. 7, *a-c* ist die Grenze Ekto-Entoplasma in der Zone des blasigen Ektoplasma noch ebenso scharf abgesetzt wie bei der normalen „ruhenden“ Zelle. Im Laufe der Konzentrierung der Blase auf engeren Raum (*a* und *b*, Abb. 6) wird sie allmählich unscharf. Diese Unschärfe dürfte jedoch mit dem Konzentrierungsvorgang zusammenhängen, durch den die Grenze Ekto-Entoplasma aus dem Schärfentiefebereich des optischen Schnittes verlagert wird. Ohne ein Abtasten der Zelle durch Fokussieren ist es bei den Teilbildern *a* und *b* der Abb. 6 nicht möglich, den genauen Verlauf der Grenze zwischen Rinden- und Markschicht im Bereich der „Blase“ festzustellen; an den photographischen Teilbildern läßt sich dies leider nicht mehr nachholen.

5. War die Aufblähung des Ektoplasma von *A* schon vor der Berührung mit *B* vorhanden oder ist sie eine Folge der Einleitung der Plasmogamie?

Abb. 7, a zeigt *A* und *B* schon in breiter Berührung, und zwar an der Stelle des noch relativ niedrigen, nur leicht aufgeblähten Ektoplasma. Auf Grund der Beobachtungen an vielen anderen Plasmogamien kann man mit Sicherheit sagen, daß die Berührung höchstens 2–3<sup>m</sup> besteht. Aus der sehr langsamen Veränderung der Blasengestalt im weiteren Verlaufe der Zeitrafferfilm-Aufnahme kann geschlossen werden, daß die „Aufblähung“ nicht erst im kurzen Zeitraum der Berührung mit *B* entstanden sein kann und daß sie demnach keine Folgeerscheinung der beginnenden neuen Plasmogamie darstellt. Übrigens liegt zu der fraglichen Zeit die Stelle stärkster blasiger Ausdehnung sehr weit von der Berührungsstelle entfernt (Abb. 7, a). Die ektoplasmatISChe „Aufblähung“ war demnach zu Beginn der Plasmogamie mit *B* bereits vorhanden.

6. Ist die „Blasenbildung“ eine Folge der vorausgegangenen Plasmogamie von *A* mit dem in Rückbildung begriffenen Partner, der sich noch durch das dichtere Entoplasma in *A* kenntlich macht?

Auf Grund der nur subjektiv beobachteten Vorgeschichte von *A* kann diese Frage mit großer Sicherheit bejaht werden. Abb. 7 soll durch die leicht schematisierte Darstellung von sechs Phasen des mikrodynamischen Verhaltens des z. T. blasenförmig umgestalteten Ektoplasma von *A* die Deutung erhärten, daß diese auffällige und offenbar sehr seltene temporäre Strukturänderung eine Folgeerscheinung der vorausgegangenen Plasmogamie von *A* ist. Wie schon angedeutet, ist das Doppeltier *A* aus der Plasmogamie eines normalen *Actinosphaerium* — etwas größer als *B* — mit einem in Rückbildung befindlichen (oder anders ausgedrückt: die Vorbereitung zur Encystierung einleitenden) Tier entstanden.

Nur wenige, meist radiär eingestellte plasmatische Wände trennen die großen Alveolen voneinander. Infolge dieser Bereitschaft zum Ruhestadium, das demnach auch morphologisch zu erkennen ist, kann man nicht annehmen, daß von diesem Tier eine aktive Annäherung zur Plasmogamie ausgegangen ist. Leider kann über das Verhalten der Axopodien bei der Einleitung dieser Plasmogamie nichts ausgesagt werden, da dieser zurückliegende Vorgang ja nicht unter Zeitraffung gefilmt wurde. Vielleicht wurde das encystierungsreife Tier vom anderen „Partner“ zuerst als „Beuteobjekt“ behandelt, und die Vereinigung nach Art einer Plasmogamie kam erst dann zustande, als es sich ergab, daß das Objekt als Nahrungsmaterial, vielleicht wegen seiner Größe, ungeeignet war. Kurzum, es gelang schließlich doch die Vereinigung der heterogenen Entoplasmakugeln und endlich auch die „Verlötung“ der so verschieden strukturierten Ektoplasmaanteile zum „Pseudoeindivuum“ *A*.

Abb. 7, a–e läßt deutlich erkennen, daß das „blasenförmige“ Ektoplasma von *A* sich genau in der Zone des dichten, undurchsichtigen Entoplasma des ehemaligen in Rückbildung befindlichen Partners befindet und vor der Konzentrierung der „Blase“ (a, b, c) dieses Entoplasma umschließt. Während in a und b im aufgeblähten Anteil noch einige

kurze, bis zum dichten Entoplasma vorstoßende Axopodien und damit auch plasmatische Wände nachweisbar sind, ist dies in *c* nicht mehr der Fall. Offenbar konfluieren bei der Blaskonzentrierung diese letzten „Vakuolenwände“ als Vorbereitung zur späteren Entleerung der „Blase“ (zwischen *e* und *f*). Es werden also nicht mehrere Teilentleerungen einzelner großer Flüssigkeitsvakuolen vorgenommen, etwa auf der Phase *b*, sondern die Beseitigung der nunmehr hindernden Flüssigkeitsansammlung erfolgt plötzlich (leider in einer Beobachtungspause der Zeitrafferfilm-Aufnahme!).

Bei der Plasmogamie von *A* und *B* (Abb. 7, *a*–*d*) zeigt das Verhalten der Axopodien, daß von Anfang an eine „Stimmung“ für eine Plasmogamie vorhanden ist. *B* berührt *A* an einer Stelle noch relativ „normalen“ Ektoplasma von *B*.

Es laufen also hier zwei Vorgänge parallel miteinander ab; 1. Konzentrierung der „Blase“ bis zu einem entleerungsfähigen Zustand (Abb. 6, *b*) und 2. die Plasmogamie mit *B*. Die Berührung von *B* mit *A* erfolgt zunächst an einer Stelle, die gerade noch eine Vereinigung zustande kommen lassen kann; erst später gerät diese Region in den Bereich der Konzentrierung der „Blase“. Hieraus kann geschlossen werden, daß der „Impuls“ zur Plasmogamie von *A* und *B* von *B* ausgeht, das sich in normaler Lebensphase befindet. Bemerkenswert ist, daß *A* trotz eingeleiteter Plasmogamie mit *B* die Angleichung des ehemaligen reduktionsreifen Partners an die „Normalstruktur“ völlig unabhängig von der neuen Plasmogamie mit *B* durchzuführen imstande ist, indem zuerst einmal die störende Flüssigkeit zusammengedrängt und entleert wird. Nach dieser „Rückentwicklung“ verläuft die Plasmogamie mit *B* sehr schnell in der üblichen Weise (Abb. 6, *c*). Nur das jetzt in der Mitte von *A* + *B* gelegene dichte Entoplasma (*d*) verrät noch die früheren Vorgänge. Jetzt scheint zunächst keine „Stimmung“ mehr für eine neue Plasmogamie vorhanden zu sein (Verhalten der Axopodien in *d*).

Die gesamten Vorgänge der Einstellung 48 sind ein gutes Beispiel für die überaus große Restitutionsfähigkeit der Zelle von *Actinosphaerium eichhorni*.

Die „Blasenbildung“ ist als Restitutionsvorgang nach einer Plasmogamie zwischen zwei ungeeigneten, auf verschiedenen physiologischen und morphologischen Stadien befindlichen Partnern aufzufassen. Die gleichzeitig neu eingeleitete Plasmogamie ist mit diesem Vorgang „kausal“ nicht verknüpft und läuft unabhängig von ihm ab.

### III. Plasmogamie zwischen mehreren Partnern

Unbeeinflusste Plasmogamien zwischen mehr als zwei Partnern wurden oft beobachtet, vor allem Vereinigungen von drei Tieren. Die Plasmogamien zwischen drei, vier und in seltenen Fällen mehr Tieren verlaufen in den Grundzügen in der gleichen Weise wie zwischen zwei Partnern. Liegen z. B. drei *Actinosphaerien*, die sich bereits berühren, in einer Geraden, so verschmelzen die beiden außen gelegenen Tiere jedes für sich mit dem

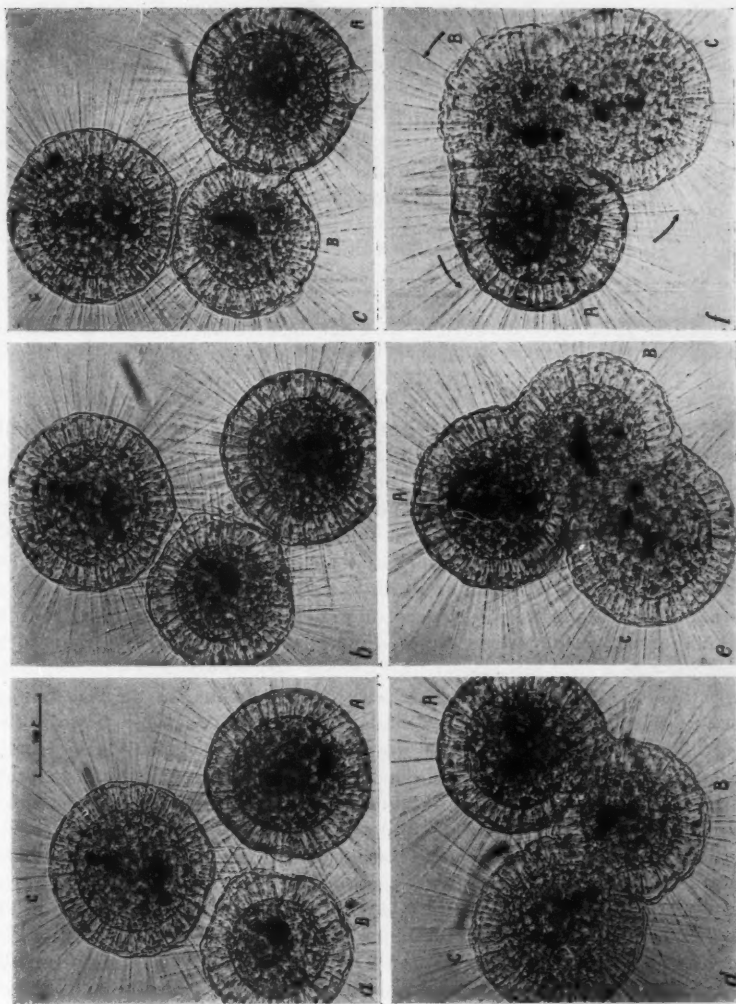


Abb. 8 (Einstellung 72). Drei *Actinosphaerien* während gleichzeitiger Plasmogamie. *A* mit Neutralrot vital gefärbt. *A* und *C* leiten die Plasmogamie mit *B* synchron ein (*b*–*d*). *A*, *B* und *C* rotieren gemeinsam entgegen dem Uhrzeiger (s. Pfeile in *f*). Dadurch Erleichterung der Plasmogamie zwischen *A* und *C*. In *e* kommt die Berührung von *A* und *C* zustande. *f*: Verschmelzung von *C* mit *B* nahezu beendet, desgleichen von *A* mit *B*. *A* und *C* in breiter Berührung. Teilstrich = 0,1 mm. Zeitangaben im Text.



Mitteltier, als ob überhaupt kein anderer Partner vorhanden wäre. Liegen die drei Partner infolge der offenbar an jeder beliebigen Stelle der „nicht-polarisierten“ Kugeloberfläche möglichen ersten Berührung nahezu in der Ebene eines Dreiecks, so kommen zwei Partner zunächst mit dem zwischen ihnen liegenden dritten Tiere in die einleitenden Phasen der Plasmogamie; hierdurch geraten sie näher aneinander und leiten auch zwischen sich selbst die Vereinigung ein. In der Phase der „Verlötung“ (s. o.) der Ektoplasmaanteile kommen dann recht verwickelte Strukturen zustande. Auch bei der gleichzeitigen Plasmogamie von mehr als zwei Partnern laufen alle Phasen mit völlig gleichförmiger Geschwindigkeit ab, es können durch die Änderung des Zeitmomentes keine Bewegungsrhythmen festgestellt werden. Liegen mehrere *Actinosphaerien* in der ersten zufälligen Berührung in einer mehr oder weniger geraden Kette, so können auch bemerkenswerte Einkrümmungen der Tiere dieses instabile Stadium abkürzen.

Einstellung 72, Abb. 8, a, zeigt drei mittelgroße *Actinosphaerien* mit typischen Anzeichen beginnender Plasmogamie; das rechts unten gelegene Tier A wurde vital mit Neutralrot gefärbt, es erscheint daher in der Photographie dunkler. B und C sind in der Näherungszone bereits abgeplattet. 7<sup>m</sup> 52<sup>s</sup> später (b) haben sich B und C fast bis zur Berührung genähert, A und C sind weiter voneinander entfernt, weil sich A nach links unten bewegt hat. Während in Teilbild a einer Abflachung von A genau parallel eine ähnliche von B gegenüberliegt (A zeigt eine kontraktile Vakuole genau in der Mitte dieser Abflachung), berühren sich infolge der Drehung von A jetzt die unteren „Eckpunkte“ der Abplattung von A und B. In Teilbild c (4<sup>m</sup> 46<sup>s</sup> seit b) befindet sich B in flächenhafter Berührung mit A und C; die Vitalfärbung von A hindert oder verzögert also keinesfalls die Plasmogamie. Teilbild d (11<sup>m</sup> 22<sup>s</sup> seit c) zeigt, daß sich die in Plasmogamie befindliche „Dreiergruppe“ langsam entgegen dem Uhrzeigersinn gedreht hat. A und C haben sich eingekrümmt und berühren sich beinahe. Die gleichzeitige Plasmogamie zwischen A und B und C und B befindet sich gerade in der Phase des „Entoplasma-Durchbruches“, die auf diesem Teilbild besonders instruktiv zum Ausdruck kommt. Infolge der aktiven Drehung der drei Partner liegt in Teilbild e (12<sup>m</sup> 32<sup>s</sup> seit d) das vitalgefärbte Tier A jetzt im Bilde oben. Die Einkrümmung von A und C gegeneinander ist bis zur breiten Berührung vorgeschritten. Die Plasmogamie von A und C mit B läuft in durchaus normaler Weise ab, auch beim Neutralrottier A: Phase der „Verlötung“ der Ektoplasmaschichten. 10<sup>m</sup> 10<sup>s</sup> später (Teilbild f, 52<sup>m</sup> 58<sup>s</sup> seit a) ist die Plasmogamie von A und C mit B beendet, es beginnt die Phase der Abrundung. In der Vereinigungsfurche zwischen A und C, und zwar auf ihrem Grunde, findet gerade die Umgestaltung der sich berührenden Ektoplasmaschichten statt; die Furche verstreicht allmählich.

Bemerkenswert ist die sehr scharfe Abgrenzung des Entoplasma von A gegen B in Gestalt der ehemaligen Krümmungslinie des Entoplasma von A. Zwischen dem Entoplasma von C und dem von B ist keine derartige scharfe Grenzlinie zu beobachten.

### Zusammenfassung über die Einstellung 72 (Abb. 8, a–f)

Ein mit Neutralrot vitalgefärbtes *Actinosphaerium* führt eine Plasmogamie in normaler Weise mit einem wenig kleineren Partner durch; ein gleich großes Tier wie das vitalgefärbte kommt gleichzeitig mit dem kleineren Partner zur Verschmelzung. Die drei vereinigten Tiere bewegen sich relativ schnell im Zeitrafferlaufbild, und zwar in Form einer Drehbewegung entgegen dem Uhrzeigersinn. Während dieser Drehung krümmen sich die beiden, sich mit dem kleineren, dritten Partner vereinigenden Tiere bis zur gegenseitigen Berührung ein. Dieser Vorgang erinnert in seinem Ablauf an das Zellengleiten, die „Cytolisthesis“ (W. Roux), bei künstlich isolierten Blastomeren von sich furchenden Amphibienkeimen. Das Verhalten der Axopodien der „Partner“ zu Beginn der Plasmogamie war sofort „positiv“, d. h. sie wurden kaum aus ihrer normalen radiären Stellung an den Berührungszonen der Partner gebracht; es treten keine Verbiegungen oder sichtbaren Einschmelzungen von Axopodien in diesem Falle auf. Man könnte den Doppelvorgang hier als „Schnell-Plasmogamie“ bezeichnen. Die vitale Neutralrotfärbung des einen Tieres ermöglicht die genaue Feststellung, daß bei der Verschmelzung die Entoplasmaanteile sich offenbar nicht durchmischen, denn die ehemalige Entoplasmaabgrenzung von A gegen B ist gegen Ende der Zeitrafferfilm-Aufnahme noch deutlich sichtbar.

### IV. Trennungen

In „Populationen“ von *Actinosphaerium eichhorni*, in denen zahlreiche Plasmogamien vorkommen, findet sich auch ein hoher Prozentsatz von Trennungen. Meist werden sich solche Tiere trennen, die vorher Plasmogamien eingegangen sind, also „Pseudoindividuen“, die sich schon durch ihre Größe als „Doppel- oder Mehrfachtiere“ verraten. Wie schon angedeutet, kann nur eine Korrelationsanalyse an Hand von großem Zahlenmaterial mit Messungen am lebenden sowie fixierten und gefärbten Zellmaterial (Kernauszählungen!), in Verbindung mit biologischen Beobachtungen des Verhaltens, vielleicht eine Klärung über die Frage bringen, ob jeweils eine Trennung oder eine echte „Teilung“ vorliegt. Die Bezeichnung „Teilung“ ist bei *Actinosphaerium* besser durch „Plasmotomie“ zu ersetzen; sie führt zur Vermehrung ohne vorherige Verdoppelung der Kernzahl (Doflein). Die Vielkernigkeit des polyenergidigen *Actinosphaerium* erschwert derartige Untersuchungen erheblich. In unserem Material dürften wohl nur Trennungen nach Plasmogamien vorliegen. Nur ein sehr großes Zahlenmaterial könnte sichere Auskünfte geben über die durchschnittlich zwischen Plasmogamie und Trennung verstreichende Zeit in einem bestimmten Biotop. Die in einem anderen Lebensraum unter anderen Bedingungen vorkommenden Tiere werden wahrscheinlich andere Werte für diesen Zeitabschnitt zeigen. Über Versuche zur experimentellen Beeinflussung der Plasmogamien, bei denen häufig auf die Vereinigung — nach Aufhören des die Plasmogamie begünstigenden Reizes (z. B. Zentrifugierung) — unmittelbar die Trennung folgte, wird an anderer Stelle berichtet.

Hier interessiert vorwiegend die Mikrodynamik des Trennungsvorganges unter Berücksichtigung der temporären Strukturänderungen des Cytoplasma.

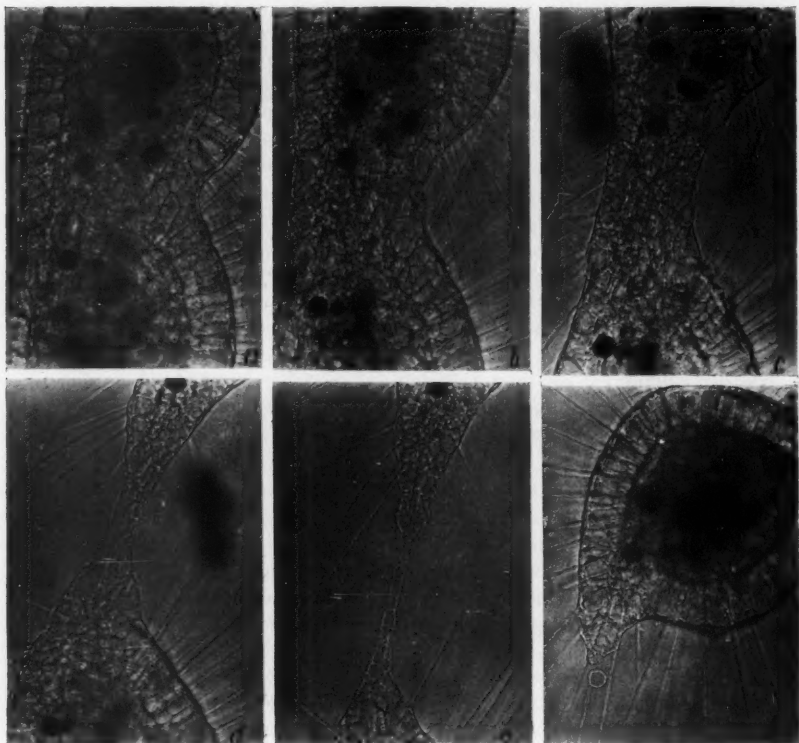


Abb. 9 (Einstellung 45). Trennung in zwei „Pseudoidividuen“. a: Beginn der Trennung; rechts tiefere Einbuchtung. Sie spricht für einen einseitigen, aktiven Vorgang. b: Trennungszone schmäler geworden; links immer noch fast gerader Verlauf des Außenkonturs. c: Im Ektoplasma der Trennungszone nur noch eine Lage von ektoplastischen Flüssigkeitsalveolen. Entoplasma in der Trennungszone allmählich in die „Trennungspartner“ abgedrängt. d: Kein Entoplasma mehr im „Trennungsstiel“. Ektoplasmaalveolen berühren sich. e: Trennungszone zu einer einzigen Lage von ektoplastischen Alveolen ausgezogen. f: Kurz vor der Aufnahme eines „Plasmatröpfchens“ in die „Stielbasis“ des oberen Tieres. Erst nach Aufnahme dieser kleinen Plasmakugel zerreißt der Protoplasmafaden. Teilstrich = 0,1 mm. Zeitangaben im Text.

Läßt man eine Mikrozeitraffer-Filmaufnahme einer Plasmogamie rückwärts ablaufen, so ergibt sich keineswegs der Eindruck einer Zeitrafferfilm-Aufnahme der Trennung in zwei „neue“ „Individuen“. Es ist vor allem die Endphase des Trennungsvorganges durch das Ausziehen eines langen, dünnen Ektoplasma-

fadens gekennzeichnet, die sich völlig von der Anfangsphase einer Plasmogamie unterscheidet.

Die Einstellung 45 gibt bei stärkerer Vergrößerung einen Eindruck von sechs Phasen des Trennungsvorganges, der übrigens bei *Actinophrys sol* in der gleichen Weise abläuft.

In Teilbild a der Abb. 9 erkennt man, daß die Trennungsfurche nur rechts tief einzuschneiden beginnt, während auf der linken Seite nur eine sehr gering ausgeprägte Einbuchtung sichtbar ist, die kaum die Bezeichnung „Furche“ zuläßt und fast einer Geraden nahekommt.

Bei der Plasmogamie ist es offensichtlich für die Zelle nicht „einfach“, das sehr widerstandsfähige Ektoplasma in der ersten Berührungszone erst einmal „einzuschmelzen“, damit die offenbar weniger stark gelatinisierten Entoplasmaanteile sich miteinander verbinden können.

Bei der Trennung liegt die Aufgabe vor, sobald die erste Streckung erfolgt ist, ein mehr oder weniger genau zylindrisches „Ektoplasmarohr“, das völlig mit Entoplasma angefüllt ist, allmählich im Querschnitt so weitgehend zu verengen, daß das Entoplasma verdrängt wird und sich schließlich die ektoplastischen „Wandungen“ berühren. Der Vergleich mit dem Ausziehen eines Glasrohres ist durchaus angebracht: Der Eindruck im Zeitrasterlaufbild ist der gleiche. Die hier abgebildete Asymmetrie in der Furchengegend (links nahezu gerader Kontur, rechts typisch eingebuchtet) ist häufiger, als man zunächst annehmen möchte.

Auch bei der Trennung stellen die Axopodien wieder Indikatoren dar für die Lage der ektoplastischen Alveolenwände: nur an der rechten, eingebuchteten Seite sind die Axopodien gekreuzt.

Die Stellung der Vakuolenwände im Bereich der Trennungszone entspricht deutlich den jeweilig herrschenden mechanischen Beanspruchungen. In Teilbild b (4<sup>m</sup> 24<sup>s</sup> seit a) beachte man den infolge der Streckung erheblich größer gewordenen Abstand der dunklen Nahrungsvakuolen in der Trennungsregion. Die noch bestehende Verbindungsbrücke ist 105  $\mu$  breit. Die linke Seite wird nunmehr auch allmählich leicht durchgebogen; die Asymmetrie bleibt jedoch bis zum Durchreißen des ektoplastischen Fadens deutlich erkennbar. In Teilbild c (4<sup>m</sup> 12<sup>s</sup> seit b) ist die Verbindungsbrücke bis auf 68  $\mu$  ausgezogen. Das „Ektoplasmarohr“ hat an der dünnsten Stelle einen Entoplasmainhalt von 35  $\mu$  Durchmesser. Rechts unter stumpfem Winkel gekreuzte Axopodien; links mehr oder weniger parallel stehende, nach unten (im Bilde) weisende Axopodien. Die Flüssigkeitsvakuolen des Ektoplasma in der Trennungszone sind infolge des auf sie ausgeübten Zuges deutlich in der Zugrichtung gedehnt. 5<sup>m</sup> 30<sup>s</sup> später, in Teilbild d, ist sämtliches Entoplasma aus dem nur noch 22  $\mu$  breiten Verbindungsstrang in die neu entstehenden „Pseudoindividuen“ infolge des Ausziehens des „Ektoplasmarohres“ hineingedrückt worden; die noch bestehende schmale Verbindungsbrücke besteht jetzt nur noch aus Ektoplasma.

Der größte Teil des vom „Ausziehungsmechanismus“ direkt betroffenen „lebenden Substrates“ (Ento- + Ektoplasma) ist jetzt in die breit-kegel-

förmigen Ansätze an den „neuen“ Tieren hineinverlagert, die sich genau gegenüberliegen. In Teilbild *d* zeigt das untere „Tier“, daß die Höhe dieses Kegels eher tangential als radial zum Zellkörper eingestellt ist.

Die Lage der entstehenden beiden Tiere zu den auf einer Geraden liegenden „Höhen“ der ektoplasmatischen, in den Verbindungsfaden übergehenden Kegel beweist, daß die beiden Teilprodukte, die ja in ihren distalen Teilen Kugelgestalt aufweisen, während der Trennung Drehbewegungen auszuführen versuchen; das untere Tier führt eine sehr langsame Drehung entgegen dem Uhrzeigersinn aus, das obere im Sinne des Uhrzeigers. Der Verbindungsstrang verhindert selbstverständlich, daß eine wirkliche Drehung zustande kommt; es resultiert — mikrodynamisch gesehen — die exzentrische Verschiebung der kegelförmigen proximalen Anteile des noch bestehenden Verbindungsstranges (s. Abb. 9, *d* und *f*).

Infolge des auf den Verbindungsstrang ausgeübten kontinuierlichen Zuges werden die den Mittelteil des Stranges allein zusammensetzenden ektoplasmatischen Flüssigkeitsalveolen dauernd passiv gegeneinander verschoben, so daß der Außenkontur immer glatt erscheint (*d*). Schließlich wird der dünne Mittelteil nur noch von wenigen mehr oder weniger reihenförmig angeordneten Flüssigkeitsvakuolen gebildet. 1<sup>m</sup> 48<sup>s</sup> nach *d* stellt Teilbild *e* den nur noch aus einer Reihe von Alveolen bestehenden „Verbindungsfaden“ dar, der an der schmalsten Stelle  $9\mu$  mißt. Es liegen perlschnurartig nebeneinander aufgereiht ellipsoide und kugelige Flüssigkeitsvakuolen; man erkennt deutlich, daß die Alveolen durch ein sehr zartes „Häutchen“, offenbar die „Pellicula“, zusammengehalten werden. In den kegelförmigen, jederseits auf den dünnen Ektoplasmafaden folgenden Regionen der beiden auseinanderweichenden „Tiere“ sieht man zunächst mehrere kleine Vakuolen, harmonisch in der Größe ineinandergefügt, dann seitlich größere Ektoplasma- und Entoplasmaanteile zwischen sich aufweisen. Auch hier kann der Zusammenhalt nur durch die sehr zarte, aber elastisch-feste „Pellicula“ gewährleistet werden.

In Teilbild *e* beachte man noch — rechts — die stark gebogenen Axopodien, die sich auf dieser Phase der Trennung kaum noch kreuzen, sondern schon beinahe parallel zueinander stehen.

Im Laufe der weiteren Dehnung des dünnen Mittelteiles verschwinden die reihenförmig angeordneten Flüssigkeitsvakuolen; ob sie ihren Inhalt nach außen entleeren, kann nicht mit Sicherheit festgestellt werden. Es resultiert auf der letzten Trennungsphase ein etwa  $2\mu$  dicker Protoplasmafaden, der sich aus der „Pellicula“ und aus Alveolenwänden zusammensetzen muß. Optisch erscheint der Plasmafaden zunächst nicht weiter auflösbar.

Bei der „Einschmelzung“ der letzten, in einer Reihe angeordneten Flüssigkeitsvakuolen ist eine Alveole nicht erfaßt worden, wie aus Teilbild *f* der Abb. 9 (14<sup>m</sup> 24<sup>s</sup> seit *e*) hervorgeht. Die aus ihrem Verband gerissene Vakuole hat sich, da der Druck benachbarter Alveolen fehlt, völlig abgekugelt; ihr Durchmesser mißt  $12\mu$ . Diese einzelne, am dünnen letzten



Verbindungsfaden haftende Flüssigkeitsvakuole wird mit gleichbleibender Geschwindigkeit — am Plasmafaden gleitend — zum nächstgelegenen „Trennungspartner“ „befördert“. Von Interesse ist nun, daß der Rest des kegelförmigen Ektoplasmafortsatzes hier viel länger erhalten bleibt als beim anderen Partner, nämlich um so viel länger, als der Transport der Einzelalveole bis zum Kegelfortsatz dauert. Bei Berührung mit der Spitze des Kegels, die jetzt schon gegenüber dem Plasmafaden halbkugelig abgesetzt ist, wird die Alveole sofort aufgenommen, worauf auch der kegelförmige Fortsatz eingezogen und nach Durchreißen des dünnen Plasmafadens zur Abrundung gebracht wird.

Bei Teilbild *f* achte man noch auf die z. T. bereits erfolgte Umgruppierung der ektoplasmatischen Flüssigkeitsvakuolen in der ehemaligen Trennungszone, ferner noch einmal auf die exzentrische Lage des kegelförmigen Trennungsfortsatzes, hervorgerufen durch den oben erwähnten Drehungsversuch während der Trennung.

Es erhebt sich die Frage, ob die wirklich erreichte kleine Drehung der neu entstehenden beiden Tiere eine funktionelle Bedeutung für den Trennungsvorgang hat. Zweifellos wird durch Drehbewegungen der sich trennenden Partner im entgegengesetzten Sinn bei beiden beteiligten Tieren eine Verstärkung des Zuges auf den Verbindungsstrang bewirkt. Ob es sich im vorliegenden Falle um eine zufällige Sondererscheinung handelt oder ob derartige „Abdrehbewegungen“ während der Trennung nur bei besonders festen Ektoplasmastrukturen ausgelöst werden, kann noch nicht entschieden werden. Starke Drehungen kommen, wie H. Wittmann 1943 (Dissertation) bei der Teilung von *Amoeba sphaeronucleolus* mit Hilfe des Zeitrafferfilms feststellte, beim „Ausziehen“ des offenbar sehr festen Verbindungsstranges der Teilungspartner dieser zur *Verrucosa*-Gruppe gehörenden *Amoeba* vor.

### V. Gleichzeitige Plasmogamie und Trennung

Das Material der Einstellung 53 befand sich im gleichen Präparat wie das der Einstellung 52, das 1<sup>h</sup> vorher unter Zeitraffung aufgenommen wurde. Das Präparat wurde jetzt auf drei Seiten mit Paraffin umrandet; die freie vierte Seite erhielt einen großen, nur sehr langsam verdunstenden Wassertropfen.

In Teilbild *a* der Abb. 10 nähert sich *A* dem bereits Anzeichen beginnender Trennung aufweisenden Doppeltier *B + C*; aus dem Verhalten der Axopodien von *A* und *B* in der Näherungszone kann mit Sicherheit geschlossen werden, daß eine Plasmogamie zustande kommen wird. *B* zeigt zwei durch die lebhaftes Annäherungsbewegung von *A* leicht zur Seite gebogene Axopodien, deren distale Enden sich nahezu tangential an *A* anlegen. Zwischen *A* und *B* scheinen die ersten Axopodien gerade „eingeschmolzen“ zu werden. Die beginnende Trennung von *B* und *C* verläuft nicht symmetrisch in der Einschnürungszone (s. Abb. 10, *a*, *b*, *c*). Die Asymmetrie liegt vorwiegend im Verhalten von *C* begründet. *B* enthält im Entoplasma, an der Grenze zwischen *B* und *C*, eine gerade eben erkennbare

große kugelige Nahrungsvakuole von  $85\mu$  Durchmesser. In Teilbild *b* der Abb. 10 (12<sup>m</sup> seit *a*) liegt diese, aus dem Partner *B* stammend, infolge der Trennungsbewegung in der sich allmählich verjüngenden Trennungszone.

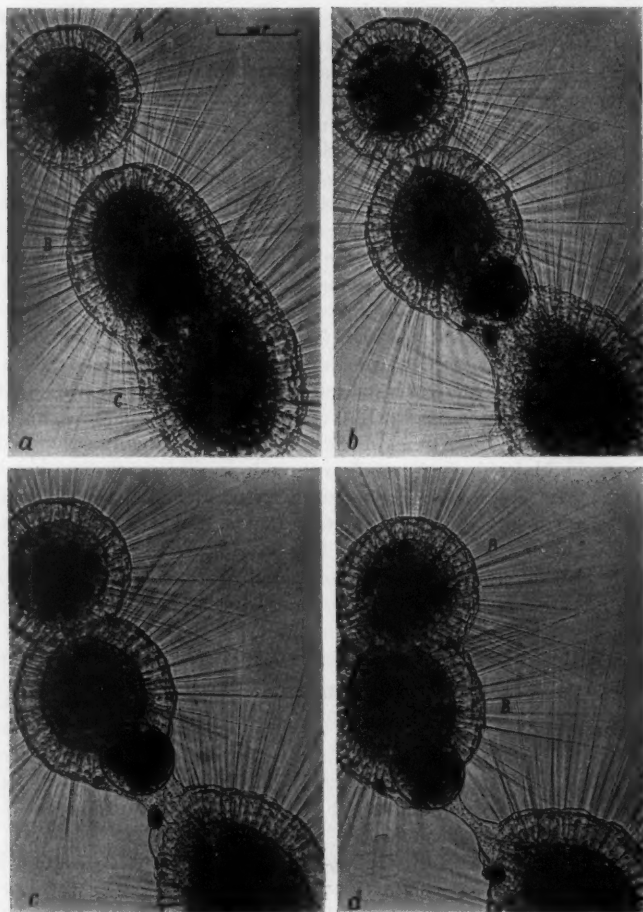
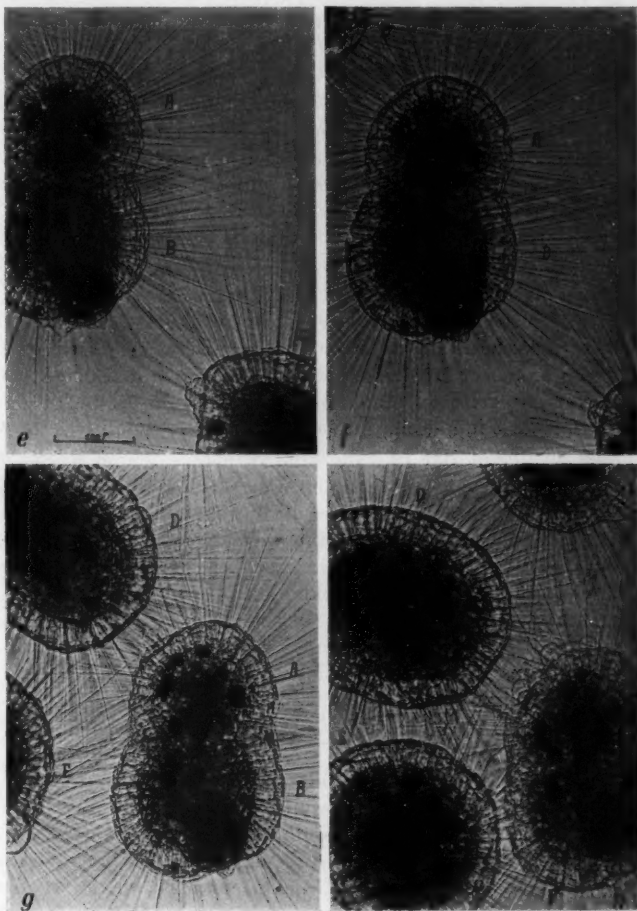


Abb. 10 (Einstellung 53). Trennung und gleichzeitige Plasmogamie mit dem einen Trennungspartner. *a*–*d*: Trennung von *B* und *C* (eine große Nahrungsvakuole gelangt in *B*); Plasmogamie von *A* und *B*. *e*–*h*: Trennung von *B* und *C*

Nur noch proximad (in bezug auf *B*) grenzt die große Nahrungsvakuole an das Entoplasma von *B*. Seitlich ist sie nur noch vom Plasma der sich allmählich im Trennungsgebiet berührenden Ektoplasmaschichten umschlossen. Das weitere Schicksal der Nahrungsvakuole bei der Trennung kann

jetzt noch nicht vorausgesagt werden. Sie kann 1. in ihren Herkunftspartner *B* zurückbefördert, 2. vom Partner *C* nach der Trennung aufgenommen werden und 3. im Verbindungsfaden liegenbleiben und gleichzeitig mit der



beendet, Verschmelzung von *A* und *B* fast vollständig durchgeführt; drei neue *Actinosphaerien* (*D*, *E*, *F*) versuchen Plasmogamie mit *AB*. Kein Nahrungsobjekt in der Nähe! Teilstrich = 0,1 mm. Zeitangaben im Text.

Trennung ausgestoßen werden. *A* und *B* berühren sich in breiter Zone; die Einleitung der Plasmogamie erfolgt in diesem Falle derart schnell, daß die Phase einer (unter Zeitraffung) sehr beweglichen, aus den „eingeschmolzenen“ Axopodien der Berührungzone entstandenen „Verbindungsschicht“

(wie bei Abb. 5 und 8) hier nicht zu beobachten war. Zwischen *A* und *B* herrscht offenbar eine für das schnelle Zustandekommen einer Plasmogamie besonders günstige physiologische Phase.

Der in Trennung von *C* befindliche Partner *B* sendet einen spitzen, sehr scharf abgesetzten Entoplasmafortsatz in Richtung auf *A* (Abb. 10, *b*). Die Breite der noch bestehenden Plasmabrücke zwischen *B* und *C* ist jetzt  $102\ \mu$ .

In Teilbild *c* der Abb. 10 (8<sup>m</sup> seit *b*) wird nunmehr deutlich erkennbar, daß die Nahrungsvakuole wieder von *B* aufgenommen wird. Der plasmatische Verbindungsstrang ist an der schmalsten Stelle jetzt nur noch  $50\ \mu$  breit. Die Nahrungsvakuole liegt offenbar auf dem Plasmastrang. Zwischen *A* und *B* befindet sich das in der Mitte der Vereinigungszone gelegene Ektoplasma in „Einschmelzung“.

In Teilbild *d* (10<sup>m</sup> seit *c*) ist der Verbindungsstrang nur noch  $10\ \mu$  breit. Die Nahrungsvakuole ragt bereits in das Entoplasma von *B* hinein; links unten von ihr sieht man einige von der Nahrungsvakuole aus ihrem Verband gedrängte ektoplasmatistische Alveolen, die beim Durchtritt durch das Ektoplasma von *B* aus ihrer Lage verschoben wurden (vgl. den umgekehrt verlaufenden Vorgang bei der Defäkation, W. Kuhl 1951, Abb. 22). Zwischen *A* und *B* steht das Entoplasma nunmehr im Zusammenhang.

Während zu Beginn der Zeitrafferfilm-Aufnahme *A* und *B* + *C* nahezu auf einer Geraden liegen (*a*), verschieben sich allmählich die Tiere gegeneinander; in Teilbild *e* (6<sup>m</sup> seit *d*) bildet die Mittelachse des neu entstandenen Doppeltieres *A* + *B* mit *C* einen Winkel von  $122^\circ$ , wobei der plasmatische Verbindungsfaden von *C* mit *B* als ein Schenkel des Winkels bei der Messung benutzt wurde. Der etwa  $1\ \mu$  dicke Plasmafaden steht unmittelbar vor dem Zerreißen. Die Nahrungsvakuole ist zu etwa drei Vierteln wieder in *B* replantiert, sie liegt über dem dünnen Plasmafaden. Die Plasmogamie zwischen *A* und *B* nimmt ihren normalen Verlauf. Oberhalb des Plasmafadens weist *B* einige distal stark gebogene Axopodien auf; es ist schwer zu entscheiden, ob die Hauptaktivität der Ortsverlagerung bei *A* + *B* oder bei *C* liegt.

2<sup>m</sup> später wird die Lage der Tiere zueinander durch Teilbild *f* der Abb. 10 wiedergegeben. Der Plasmafaden zwischen *C* und *B* ist durchgerissen; der Abstand beträgt  $172\ \mu$ . Am halbkugeligen „Trennungsfortsatz“ von *C* sind noch Reste des Fadens zu erkennen. Die Nahrungsvakuole von *B* ragt nur noch etwa  $14\ \mu$  über das Ektoplasma von *B* hinaus; in der Zone der Wiederaufnahme der Vakuole ist eine leichte Eindellung der Körperoberfläche von *B* zu beobachten. Links unten von der Nahrungsvakuole liegen immer noch einige aus dem Verband verschobene ektoplasmatistische Alveolen. *C* scheint sich aktiv von *A* + *B* nach rechts unten fortzubewegen; dies geht übrigens auch aus einigen nach rechts oben gebogenen Axopodien von *B* hervor. Von links oben nähert sich ein neuer „Partner“: *D*.

Teilbild *g* der Abb. 10 (4<sup>m</sup> seit *f*) läßt erkennen, daß sich *A* + *B* nur noch sehr langsam verändert; die Abgrenzung der Nahrungsvakuole im Entoplasma von *B* ist nicht mehr deutlich. Der neue „Partner“ *D* besteht

mindestens aus zwei durch Plasmogamie verschmolzenen Tieren. Zwischen *D* und *A* beginnt sich eine „Plasmabrücke“ auszubilden; in ihrer Region erkennt man eine kleine Eindellung bei *A*. Der Beginn der Bildung einer temporären Plasmaverbindung, auf die weiter unten genau eingegangen wird, besteht offenbar zunächst nur in der Verschmelzung von Axopodien in der „Brückenzone“. Von links nähert sich ein weiteres *Actinosphaerium*: *E*. *B* weist gegenüber *E* bereits einige gebogene Axopodien auf.

Abb. 10, Teilbild *h*, wurde 12<sup>m</sup> nach *g* aufgenommen; seit Teilbild *a* sind nunmehr 54<sup>m</sup> vergangen. Auffallend ist die erhebliche Störung der Ektoplasmastruktur von *A*, hervorgerufen durch die Plasmogamie — bzw. die „Brückenbildungsversuche“ von *D* und *E* mit *A+B*. Der Abstand von *E* und *B* (in *A+B*) beträgt nur noch 11  $\mu$ . Zwischen dem oben rechts sich nähernden *F* und *A* (in *A+B*) sind mehrere Axopodien gebogen.

Bereits 8<sup>m</sup> vor *h* setzt die auffällige Dislozierung von einzelnen ektoplasmatischen Flüssigkeitsvakuolen von *A* (in *A+B*) gegenüber *D* ein.

Über das weitere Schicksal von *A+B*, *D*, *E* und *F* kann wegen Abbruch der Filmaufnahme nichts ausgesagt werden. Nach dem Verhalten der Axopodien zu urteilen, wird es über temporäre „Brückenbildungen“ zwischen *D* und *A* (in *A+B*), *E* und *B* (in *A+B*) nicht hinausgekommen sein. *F* scheint nur vorbeizustreifen (Phobie).

#### Zusammenfassung über die Einstellung 53 (Abb. 10, *a-h*)

Ein *Actinosphaerium* kann eine schnell ablaufende Plasmogamie mit einem Doppeltier durchführen, das gerade eine Trennung durchführt. Eine große Nahrungsvakuole, die passiv in die Trennungszone geraten ist, wird in den Partner wiederaufgenommen, in dem sie vor der Trennung lag. Mit einem noch im Formausgleich befindlichen gerade neu entstandenen Doppeltier kann ein anderes, offenbar ebenfalls erst kürzlich entstandenes Doppeltier eine temporäre „Plasmabrücke“ ausbilden. Gleichzeitig kann ein weiteres *Actinosphaerium* mit dem anderen Partner Beziehungen aufnehmen.

### VI. Bildung von temporären „Plasmabrücken“ zwischen zwei Tieren mit nachfolgender Trennung

Penard (1889) führt im Kapitel „Konjugation“ (= Plasmogamie) einen beachtlichen Fall an, der sich vielleicht in Beziehung setzen läßt zu den unter Zeitraffung angestellten Beobachtungen an *Actinosphaerium*. Zwei *Actinophrys sol* verschiedener Größe lagen nahe beieinander; das vakuolisierte Ektoplasma des größeren Tieres bildete in der Berührungszone eine Vorwölbung, während das Ektoplasma des kleineren zurücktrat. Dann „vermischte sich alles“, und es bildete sich eine Brücke, die sich aus einer Kette von Vakuolen zusammensetzte, in deren Mitte ein Plasmastrang verlief. Der Vorgang dauerte eine Viertelstunde, dann trennten sich die Tiere.



Ein wesentlicher Unterschied gegenüber unseren Beobachtungen bei *Actinosphaerium* liegt darin, daß Penard den Verbindungsstrang aus

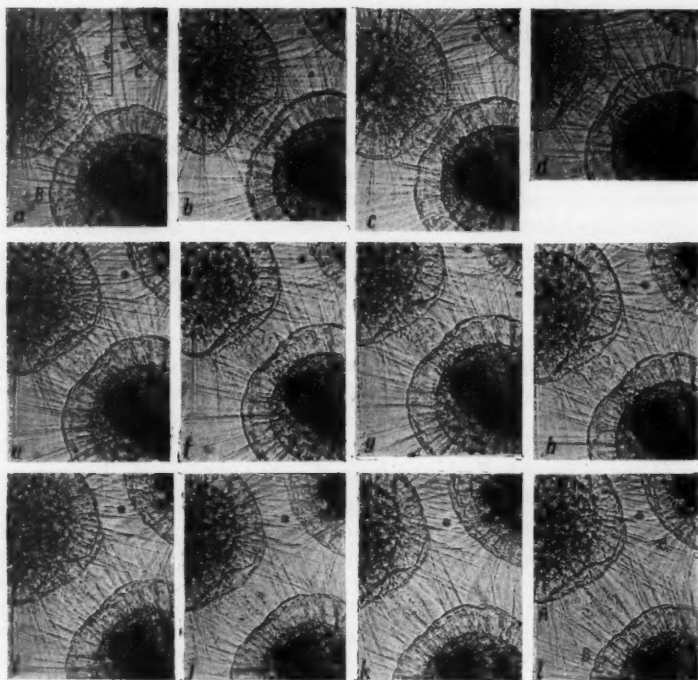


Abb. 11 (Einstellung 50). Zwölf Phasen der Ausbildung einer temporären Plasmabrücke zwischen zwei *Actinosphaerien* (A und B). Plasmabrücke im Zeitrafferlaufbild in lebhafter Bewegung! a, b, c: Annäherung der Tiere, ohne daß es zu einer direkten Berührung kommt. In der Näherungszone Eindellung des Ektoplasma bei beiden Partnern. d—l: A und B vergrößern allmählich ihren Abstand; zwischen ihnen wird eine, vermutlich aus verflüssigten Axopodien hervorgegangene, ihre Gestalt ständig ändernde plasmatische „Brücke“ ausgebildet. Etwaige Funktion noch unbekannt. l: Länge der Brücke etwa wie die doppelte Höhe des Ektoplasma. In der Brückenzone keine Axopodien. Das Plasmamaterial stammt aus in den Solzustand übergeführten Axopodien dieser Region. Von b bis l: Veränderte Ektoplasmastruktur in der Breite der temporären Plasmabrücke. Die Eindellung bei B wird allmählich ausgeglichen.

Teilstrich = 0,1 mm. Zeitangaben im Text.

Ektoplasma-Vakuolen und einem Entoplasmastrang, der zentral verläuft, bestehen läßt. Auch die Entstehungsweise aus einer Vorwölbung des Ektoplasma des größeren Tieres und einer Eindellung beim kleineren ist anders als bei *Actinosphaerium*.

Einstellung 50, Abb. 11, a-l und Abb. 12, a-l ist eine der interessantesten Mikrozeitraffer-Aufnahmen über das mikrodynamische Verhalten von *Actinosphaerium eichhorni* in bestimmten Lebensphasen. Insgesamt liegen im Präparat fünf nahezu gleich große Tiere beieinander, davon meist zwei oder drei im Bildfeld (Durchmesser: durchschnittlich  $180\ \mu$ , Höhe des Ektoplasma:  $30\ \mu$ ). Zu Beginn der Zeitrafferaufnahme hat es zunächst den Anschein, als ob drei oder sogar vier Plasmogamien zustande kommen würden; es findet jedoch im Verlaufe von etwa  $32^m$  keine Vereinigung statt! Bei den drei in ihrem mikrodynamischen Verhalten mittels Zeitrafferlaufbild- und Teilbildanalyse näher untersuchten Tieren A, B und C tritt eine Abweichung von der Kugelgestalt nur in Gestalt einer leichten Abflachung und Eindellung an den Stellen größter Annäherung auf. Die drei *Actinosphaerien* sind durch Anzahl und sehr konstant bleibende Anordnung der Nahrungsvakuolen leicht zu unterscheiden und wiederzuerkennen; A hat die geringste Anzahl, B die größte.

Im Laufe der Beobachtungszeit von etwa  $32^m$  kommen zweimal temporäre „Plasmabrücken“ zustande, und zwar zuerst zwischen A und B, später zwischen A und C. Beide „Plasmabrücken“ werden nach einiger Zeit wieder aufgehoben.

Da im Schrifttum über derartige Bildung bei *Heliozoen* keine Angaben gefunden wurden, was nicht erstaunlich ist, da die übliche subjektive Beobachtungsweise und -zeit zur Entdeckung derartiger Vorgänge keineswegs ausreicht und erst der objektiv registrierende Mikrozeitrafferfilm die erforderliche Dauerbeobachtung gewährleistet, sollen diese funktionell schwer zu deutenden Bildungen an einer größeren Anzahl von Teilbildern erläutert werden.

Von Interesse sind zunächst die einleitenden Vorgänge zwischen den Partnern. Abb. 11, a-l gibt vorerst einen Überblick über das Anfangsverhalten der Partner A und B. Die an den ausgewählten Teilbildern der Einstellung 50 zu beobachtenden Phasen mikrodynamischen Geschehens werden in kurzen Stichworten gegeben. Abb. 12, a-l behandelt dann die „Brückenbildung“ zwischen A und B sowie A und C genauer bis zur Trennung und Wiederaufnahme der Plasmarestkörper in das Entoplasma.

Abb. 11, Teilbild a: Abstand zwischen A und B:  $6\ \mu$ . Tiefe der Eindellung bei A:  $17\ \mu$ , bei B nur  $9\ \mu$ . Gebogene Axopodien nur zwischen A und C. In sämtlichen Teilbildern der Abb. 11 zeigt B im Ektoplasma der Brückenregion deutliche Strukturänderungen, besonders deutlich bei c, d, e und f.

b ( $1^m\ 31^s$  seit a): Verbreiterung und Vertiefung der Eindellungen. An der engsten Stelle des Zwischenraumes von A und B undeutlich voneinander abgesetzte, bereits verflüssigte oder gerade in Verflüssigung begriffene Axopodien. Im Zeitrafferlaufbild ist diese Region in lebhafter Bewegung!

c ( $53^s$  seit b;  $2^m\ 24^s$  seit a): Abstand von A und B:  $4\ \mu$ . Tiefe der Eindellung bei A:  $25\ \mu$ , bei B:  $7\ \mu$ . Im Ektoplasma von B in der „Brückenzone“ deutliche, granuliert-strukturierte. Im Zwischenraum zwischen A und B hyaline, verbindende Plasmamasse erkennbar; sie ist in einer wellig konturierten Bewegungsphase im Bilde festgehalten.

d ( $1^m\ 36^s$  seit c;  $4^m$  seit a): Abstand von A und B auf  $21\ \mu$  vergrößert. Die  $33\ \mu$  breite Plasmabrücke ist sehr deutlich; ihr Kontur ist nur an einzelnen, scharf

begrenzten Stellen sichtbar. Die Brücke liegt nicht genau in der Verbindungslinie der Mittelpunkte von *A* und *B*, sondern leicht tangential.

*e* (2<sup>m</sup> seit *d*; 6<sup>m</sup> seit *a*): 37  $\mu$  Abstand. Größte Breite der „Brücke“: 48  $\mu$ ; Lage fast radiär zu *A* und *B*. Brückenkontur leicht unscharf infolge der lebhaften Bewegung in der „Brücke“ (nur unter Zeitraffung sichtbar!). Breite der Eindellung von *A*: 88  $\mu$ ; Tiefe 11  $\mu$ . Bei *A* und *B* Strukturänderungen im Ektoplasma der Brückenzone, und zwar genau in der Breite der „Brücke“.

*f* (48<sup>s</sup> seit *e*; 6<sup>m</sup> 48<sup>s</sup> seit *a*): Abstand von *A* und *B*: 41  $\mu$ . Eindellung von *A* auf 21  $\mu$  vertieft; bei *B* immer noch sehr flach.

*g* (24<sup>s</sup> seit *f*; 7<sup>m</sup> 12<sup>s</sup> seit *a*): Die Brücke zeigt an einigen Stellen, die sich ungefähr gegenüberliegen, scharf lokalisierte Strecken mit deutlichem Kontur. Diese Orte stellen „Knotenpunkte“ der wogenden Bewegungen innerhalb der „Plasmabrücke“ dar. Man beachte bei *B* die Veränderung der Ektoplasmastruktur genau in der Breite der Brücke. Die Grenze Ekto-Entoplasma ist hier undeutlich.

*h* (24<sup>s</sup> seit *g*; 7<sup>m</sup> 36<sup>s</sup> seit *a*): „Knotenpunkte“ in der wogenden Bewegung der „Brücke“ genau an gegenüberliegenden Stellen! Dazwischen unscharfer Kontur. Bei *A* sehr lebhafte Bewegungen im Grunde der Eindellung. Deutliche Verbindung der „Brücke“ über strukturell verändertes Ektoplasma mit dem Entoplasma; bei *B* ähnliche Strukturänderungen.

*i* (24<sup>s</sup> seit *h*; 8<sup>m</sup> seit *a*): Tierabstand auf 51  $\mu$  vergrößert. In der 154  $\mu$  umfassenden Eindellung von *A* offenbar sehr lebhafte Plasmabewegung. „Brücke“ zeigt nur links oben scharfen Kontur.

*j* (24<sup>s</sup> seit *i*; 8<sup>m</sup> 24<sup>s</sup> seit *a*): Brückenkontur nur sehr schwach angedeutet.

*k* (24<sup>s</sup> seit *j*; 8<sup>m</sup> 48<sup>s</sup> seit *a*): Tierabstand 65  $\mu$ ; „Brücke“ ohne scharfen Kontur. In der Eindellung von *A* mehrere aus ihrer Lage gedrängte ektoplasmatistische Flüssigkeitsvakuolen; sie wölben sich nahezu halbkugelig vor.

*l* (24<sup>s</sup> seit *k*; 9<sup>m</sup> 12<sup>s</sup> seit *a*): Abstand der Tiere: 70  $\mu$ . Man erkennt, daß in der „Brückenzone“ keine Axopodien vorhanden sind (axopodienfreie Räume rechts und links der „Brücke“).

Auf Teilbild *l* folgt in etwa 3<sup>m</sup> das Teilbild *b* der Abb. 12.

In Abb. 12, *a* ist *A* von *B* nur noch 18  $\mu$  entfernt; *B* zeigt gegenüber *A* eine leichte Abflachung. Bei *A* ist der Außenkontur in der Zone der späteren „Brückenbildung“ bereits unruhig. Die Axopodien zeigen nur eine wenig gestörte Lage. 14<sup>m</sup> 42<sup>s</sup> später, *b*, ist der Abstand zwischen *A* und *B* auf 87  $\mu$  vergrößert worden. *C* hat sich *A* bis auf 19  $\mu$  genähert. Zwischen *A* und *B* spannt sich jetzt eine deutliche ektoplasmatistische „Brücke“ aus; sie ist 87  $\mu$  lang und 32–40  $\mu$  breit (32  $\mu$  bei *B*, 40  $\mu$  bei *A*). Die „Brückenbildung“ nimmt sowohl bei *A* wie bei *B* ihren Ursprung aus einer Eindellung des Ektoplasma, die bei *A* breiter und wesentlich tiefer als bei *B* ist.

Aus dem Zeitrafferlaufbild geht einwandfrei hervor, daß sich diese cytoplasmatischen „Brücken“ in ständiger lebhafter Bewegung und Umgestaltung befinden, die sogar kleine Unschärfen der einzelnen Teilbilder bewirken können. Subjektiv ist von diesen hin und her wogenden „Plasmawellen“ innerhalb der „Brückenregion“ nicht das geringste wahrzunehmen!

Der Seitenkontur des „Brückenplasma“ ist leicht wellig und z. T. infolge der Bewegung unscharf abgebildet. Das Ektoplasma von *A* und *B* zeigt in der Breite der „Brücke“ strukturelle Veränderungen. Die außerhalb des Verbindungsstranges gelegenen Axopodien sind nur in sehr geringem Umfange gebogen. Es wird der Eindruck hervorgerufen, als ob die Axopodien rechts und links (und wohl auch oben und unten) von der „Brücke“ etwas auseinandergewichen sind. Zwischen *B* und *C* sind starke Verbiegungen der Axopodien bei einem Tierabstand von  $92\mu$  erkennbar; zwischen *A* und *C* sieht man ebenfalls gebogene Axopodien. Rechts unten nähert sich *B* ein viertes Tier (Abb. 12, *b*) bis auf  $30\mu$  unter erheblicher Biegung der Axopodien. Bis zum Teilbild *f* bleibt dieses Tier (also etwa  $3^m 6^s$ ) ziemlich unverändert in dieser Lage. Da es im Gesamtverlauf der Zeitrafferfilm-Aufnahme — unter Beibehaltung der gebogenen Axopodien — zu keiner engeren Beziehung zu *B* kommt, kann dieses vierte Tier weiterhin unberücksichtigt bleiben.

Teilbild *c* der Abb. 12 ( $38^s$  seit *b*) zeigt einen stark veränderten Habitus der „Plasmabrücke“ zwischen *A* und *B*. Aus der Eindellung von *A* erhebt sich eine halbkugelige Plasmavorwölbung, die seitlich scharf konturiert erscheint, im distalen Teil jedoch einen unterbrochenen Kontur aufweist, als ob hier eine direkte Verbindung zum mittleren Teil des Verbindungsstranges vorläge. Auch *B* zeigt eine, wenn auch wesentlich kleinere Vorwölbung, genau gegenüber der von *A* gelegen; auch hier distal keine glatte Grenzlinie. Fast das gleiche Bild bietet die „Plasmabrücke“ bereits  $1^m$  früher: zwei halbkugelige Vorwölbungen, verbunden durch einen unscharf begrenzten Plasmastrang, dessen genauere Lagebeziehung zu den ektoplasmatischen Halbkugeln nicht an Hand eines Teilbildes festgestellt werden kann.

Der mittlere, unscharfe Teil der „Plasmabrücke“ befindet sich in besonders lebhafter Bewegung; er liegt offenbar höher oder tiefer als die Ebene der halbkugeligen Anteile der „Plasmabrücke“. Zwischen *A* und *C* hat sich seit Teilbild *b* nichts Wesentliches ereignet; zwischen *B* und *C* sind viele Axopodien noch stark, manchmal sogar S-förmig gebogen.

Bereits  $50^s$  später sind, wie aus Teilbild *d* hervorgeht, die halbkugeligen Vorwölbungen von *A* und *B* jetzt distal „geöffnet“; die Mittelzone der „Brücke“ zeigt immer noch keine randlichen Konture: die Bewegung war zu dieser Zeit noch nicht so lebhaft, daß sie subjektiv im seitlichen Einblickrohr während der Zeitrafferfilm-Aufnahme sichtbar werden konnte, jedoch bereits so stark, daß diese Stelle bei der Einzelaufnahme des Teilbildes, die ja eine mehrere Sekunden dauernde Zeitaufnahme ist, bereits leicht unscharf abgebildet wurde. Selbstverständlich ist auch in der Mittelzone ein mehr oder weniger scharfer Kontur vorhanden. Die scheinbare „Konturlosigkeit“ der Mittelzone der „Brücke“ ist also rein filmtechnisch bedingt und dementsprechend zu werten.

$42^s$  nach Teilbild *d* zeigt die „Plasmabrücke“ jetzt in *e* eine Verjüngung der mittleren Zone; die Brückenlänge beträgt jetzt  $120\mu$ . An der dünnsten Stelle hat sie eine Breite von  $16\mu$ . In der Mitte der „Brücke“, etwas *A* ge-

nähert, ist der Kontur links auf einer Strecke von  $10\mu$  genau so deutlich abgebildet wie an den basalen Teilen. An dieser Stelle scheint also gerade

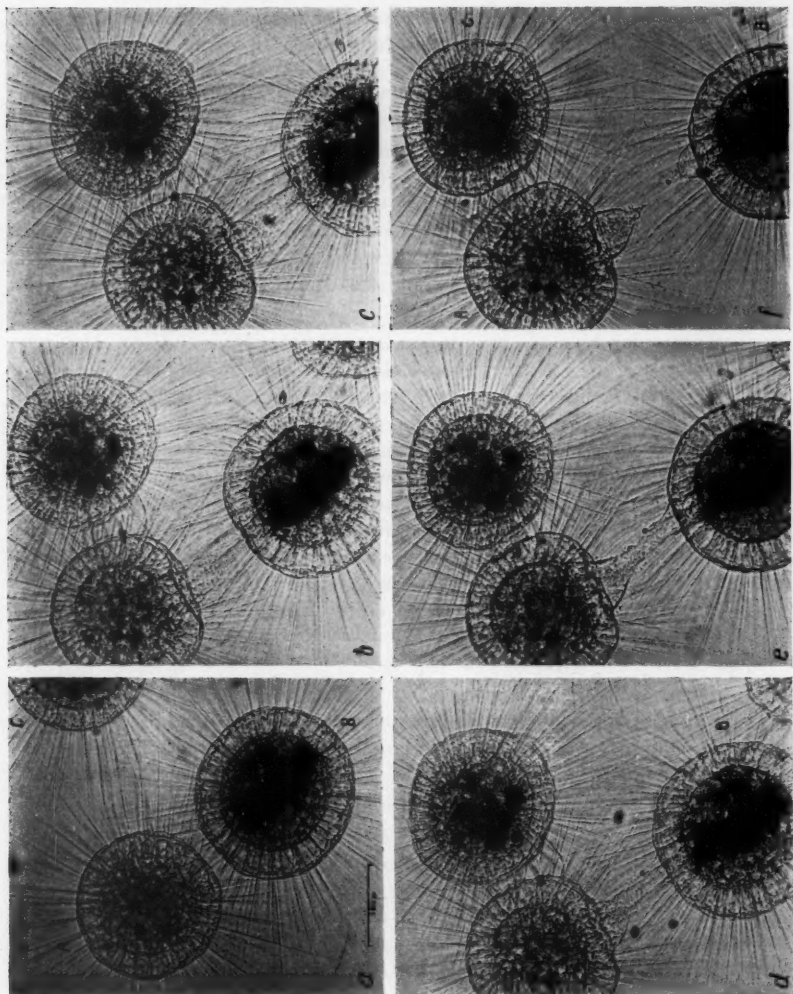
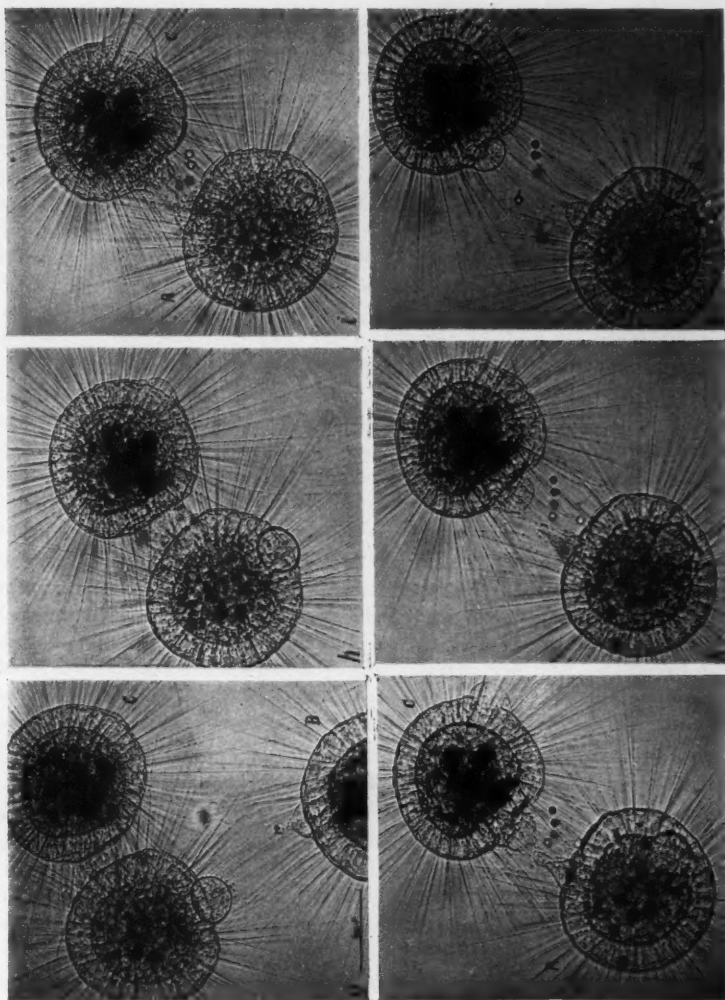


Abb. 12 (Einstellung 50). Zwölf Phasen der temporären Plasmabrücke zwischen *A* und *B* der Abb. 11 bis zur Trennung bei *f*. Aufnahme der Reste der temporären plasmatischen Brücken in *A* und *B*.

ein „Knoten“ in der mehr oder weniger wellenförmigen, wogenden Bewegung der plasmatischen Verbindung von *A* und *B* zu liegen. Daher



ist diese kleine Stelle von etwa  $10\mu$  Ausdehnung nicht „verwackelt“ und zufällig ist sie gerade in den Bereich der eingestellten Schärfentiefe geraten.



*g-l*: Das bereits in *A* sich nähernde *C* bildet eine ähnliche temporäre Brücke aus wie die zwischen *A* und *B*. Trennung bei *l*. Teilstrich = 0,1 mm. Zeitangaben im Text.

(Leider war es bis jetzt noch nicht möglich, die bemerkenswerten Bewegungsvorgänge in den temporär ausgebildeten „Plasmabrücken“ in Mikrophasen-

aufnahmen unter ständigem Fokussieren [was ja bei einer Zeitrafferaufnahme nicht zulässig ist] der stark beweglichen Mittelzone festzuhalten und auszuwerten.)

Teilbild *e* zeigt deutlich, daß die Ektoplasmastruktur der Partner *A* und *B* in der Brückenregion verändert ist gegenüber der normalen, grob-vakuolisierten Rindenschicht.

Innerhalb der nächsten halben Minute vergrößert sich der Abstand von *A* und *B* auf  $140\ \mu$ ; die Breite der „Brücke“ ist an der dünnsten Stelle nur noch  $9\ \mu$ .

In Teilbild *f* der Abb. 12 ist die „Brücke“ gerade wieder getrennt worden. Der Abstand von *A* und *B* ist in der Zerreißungsphase  $150\ \mu$ . Die Trennung erfolgt hier nicht dadurch, daß die beiden Partner einfach ihren Abstand vergrößern und dadurch den offenbar recht zähen dünnen Plasmafaden zerreißen, sondern die Trennung ist offensichtlich (Zeitrafferlaufbild!) ein aktiver Bewegungsvorgang in der Mittelzone der „Brücke“: Kein Auseinanderziehen, sondern ein aktives Auseinanderweichen.

Nach der Trennung in der Mitte bleibt bei *A* und *B* nur noch je eine große kegelförmige bis halbkugelige plasmatische Vorwölbung von der „Brücke“ übrig, die an ihrem distalen Ende noch den Plasmarest des durchgerissenen Fadens aufweisen. Nunmehr sind  $17^m\ 48^s$  seit *a* vergangen.

Es folgt nun die Aufnahme der abgekugelten Reste der „Brücke“ durch das Ektoplasma in das Entoplasma von *A* und *B*.

Teilbild *g* ( $48^s$  seit *f*) zeigt eine Phase dieses Vorganges. *B* führt langsam eine kleine Drehung im Uhrzeigersinn aus, kenntlich an der Veränderung der Lage der „Brückenreste“ zueinander. Der Abstand von *A* und *B* ist jetzt  $160\ \mu$ . Der Rest der „Brücke“ von *A* ist zu etwa einem Drittel in das Ektoplasma von *A* aufgenommen worden; am Rest von *B* ist distal noch ein kleines Stückchen des durchgerissenen Plasmafadens zu sehen.

In der ehemaligen „Brückenzone“ zwischen *A* und *B* sind keine Axopodien im Bereiche der Abbildungsschärfe zu erkennen.

In der Zeit von  $3^m\ 12^s$  zwischen Teilbild *g* und *h* vergrößert sich der Abstand von *A* und *C* von  $18\ \mu$  auf  $35\ \mu$ . Teilbild *h* der Abb. 12 zeigt den Beginn der nunmehr auch zwischen *A* und *C* einsetzenden temporären „Brückenbildung“: Abflachung der Partner, verbunden mit einer Eindellung (s. *C*); verschmolzene (= verflüssigte) Axopodien in noch lockerem, unter Zeitraffung lebhaft beweglichem plasmatischem „Verbande“, das „Material“ zur temporären „Brückenbildung“ darstellend, und einige dislozierte Flüssigkeitsvakuolen des Ektoplasma (s. *A*) in der Nähe der Ansatzstelle der neuen „Plasmabrücke“. In Teilbild *h* weist das Plasma der „Brücke“ seitlich noch keinen deutlichen Kontur auf. *A* hat den ellipsoidischen „Brückenrest“ fast ganz in die Rindenschicht aufgenommen. Die Grenze Ekto-Entoplasma ist in der Gegend der Wiederaufnahme des „Restes“ undeutlich, desgleichen in der Zone der neuen „Brückenbildung“.

Es sei hier kurz eingefügt, was Zeitrafferlaufbild- und Teilbildanalyse über das Verhalten von *A* und *C* in der Zeit von *a* bis *h* ( $= 21^m 48^s$ ) erkennen lassen. In Teilbild *a* war der Abstand von *A* und *C*  $130 \mu$ ; innerhalb von  $14^m$  nähert sich *C* *A* bis auf  $21 \mu$ . In Teilbild *d* ist der Abstand auf  $12 \mu$  verringert, und nun wiederholt sich in wesentlichen Zügen der gleiche Vorgang wie zwischen *A* und *B*. Die Annahme, daß es sich bei der temporären „Brückenbildung“ nicht um einen einzelnen Zufallsbefund handelt, sondern um einen offenbar durchaus normalen, physiologischen Vorgang, wird durch die Teilbilder der Einstellung 50 gesichert, bei der unmittelbar nacheinander und z. T. sogar gleichzeitig ein *Actinospaerium* *A* mit zwei anderen, *B* und *C*, temporäre plasmatische Verbindungsbrücken ausbildet. Wenn in Teilbild *f* die „Brücke“ zwischen *A* und *B* aufgehoben wird, befindet sich *A* und *C* noch im einleitenden „Spiel“ der Axopodien im engen Zwischenraum zwischen den „Partnern“. In beiden Fällen (*A/B* und *A/C*) wird vor der „Auflösung“ der „Brücke“ der gleiche Abstand der Partner von  $120 \mu$  hergestellt. Auch bei der temporären Verbindung von *A* und *C* herrscht in der plasmatischen Verbindungsbrücke (unter Zeitraffung!) sehr lebhaft Bewegung, besonders in der Mitte. Daher tritt auch hier wieder eine gewisse Unschärfe in der photographischen Aufnahme dieser Region auf. Die hin und her wogende Bewegung innerhalb der „Brücke“ zwischen *A* und *C* erscheint im Zeitrafferlaufbild turbulenter als zwischen *A* und *B*.

Die „Brücke“ zwischen *A* und *C* „reißt“ bei Teilbild *k* ( $25^m 48^s$  seit *a*); die Phase *k* entspricht der von *f* bei *A* und *B*. Das Teilbild *j* entspricht etwa *e*. *C* zeigt in einer Eindellung des Ektoplasma (*k*) einen halbkugeligen Plasmarest mit distalem kleinem Restanhang. Bei *A* weist der Plasmarest eine sehr spitze Kegelform auf. Das Ektoplasma von *A* ist in der Breite dieses Kegels strukturell deutlich verändert. Der spitze Plasmakegel wird erst nach weiteren  $48^s$  halbkugelig. Auch hier werden die beiden Plasmareste der „Brücke“ allmählich durch das Ektoplasma in das Entoplasma aufgenommen.

Rückblickend auf das Verhalten von *A* und *C* sei festgestellt, daß ab Teilbild *e*, Abb. 12, im Zeitrafferlaufbild lebhaft, durcheinanderwogende Protoplasmabewegungen zu beobachten sind, die ausreichen, unscharfe Zonen in den Teilbildern zu verursachen. In dieser Phase nähern und entfernen sich die beiden Partner *A* und *C* um Beträge von wenigen Mikron, von etwa  $9 \mu$ , also fast bis zur direkten Berührung, bis etwa  $24 \mu$ .

Aus den Teilbildern *e* und *f* geht hervor, daß trotz großer Nähe von *A* und *C* die Axopodien nicht abgebogen, sondern normal radiär eingestellt sind, gerade als ob der andere Partner überhaupt nicht vorhanden wäre. Irgendwo muß die Plasmamasse der Axopodien in der Zone größter Annäherung ja bleiben, denn zwischen den Partnern steht kein Raum mehr zur Verfügung. In der Zusammenfassung über die Einstellung 50 wird näher auf diese Frage eingegangen.

Wie bei *A* und *B* geht mit dem Deutlicherwerden der „Brücke“ eine allmähliche Vergrößerung des Abstandes von *A* und *C* parallel. Daß *C* der aktivere Partner ist, geht 1. aus seiner aktiven Annäherung an *A* und 2. aus den stärkeren Veränderungen des Ektoplasma in der „Brückenzone“ hervor.

In Teilbild *h* (21<sup>m</sup> 48<sup>s</sup> seit *a*) ist bei *C* in der Abflachung eine unregelmäßig konturierte tiefe Eindellung entstanden. *A* zeigt im Bereiche der Abflachung mehrere fast halbkugelig über das Ektoplasma vorgewölbte, aus ihrem Verbande verdrängte Flüssigkeitsvakuolen (s. a. W. Kuhl 1951, Abb. 22, Defäkation, Einstellung 46). 48<sup>s</sup> später tritt die „Plasmabrücke“ bei einem Tierabstand von 50  $\mu$  zuerst deutlich in Erscheinung. Sie liegt nicht genau in der Verbindungslinie der Mittelpunkte von *A* und *C*.

2<sup>m</sup> später zeigt die „Brücke“ den Habitus des Teilbildes *i*. Bei einem Tierabstand von 68  $\mu$  steht die temporäre „Plasmabrücke“ etwa auf einer Phase ihrer Ausbildung wie in Teilbild *d* zwischen *A* und *B*.

Ein Vergleich der Zeitdauer der beiden „Brückenbildungen“ *A*—*B* und *A*—*C* ist nicht genau durchzuführen, da es schwierig ist, den Beginn der temporären plasmatischen Verbindung so festzulegen, daß wirklich gleichartige Phasen vorliegen. Eine ungefähr richtige Zeit für die Dauer der „Brückenbildung“ mag mit  $\pm 5^m$  angegeben werden.

Die Wiederaufnahme der plasmatischen Reste der temporären „Brücke“ in Gestalt zweier kleiner Plasmahalbkuugeln erfolgt bei *A/C* in der gleichen Weise wie bei *A/B*.

Wie kommen die Formverschiedenheiten der Reste unmittelbar nach der Durchtrennung der „Brücke“ zustande (Abb. 12, *k*)? Bei *C* entsteht sofort eine plasmatische Halbkugel, bei *A* ein Plasmakegel. Wenn das Durchreißen des Verbindungsfadens infolge aktiven Auseinanderweichens beider Partner erfolgte, so entstünde das Bild eines in der Flamme ausgezogenen Glasstabes wie bei der Trennung zweier Tiere: es resultieren zwei annähernd gleichgestaltete Spitzen der Fäden. *C* ist zweifellos der aktivere Partner; er zeigt deshalb zuerst einen halbkugelig abgerundeten Restkörper, weil von ihm aus aktiv die Durchtrennung an der dünnsten Stelle der „Brücke“ erfolgt; *A* läßt diesen Vorgang passiv ablaufen. Im Falle von *A* und *B* scheinen beide Partner nahezu gleichzeitig den dünnen Faden zu unterbrechen.

Auf fast allen Teilbildern erkennt man deutlich, daß sich die Basis der „Brücken“ bei jedem Partner — solange die temporäre „Brückenbildung“ andauert — durch das Ektoplasma bis in das Entoplasma fortzusetzen scheint, kenntlich an einer ziemlich regelmäßigen, radiär eingestellten streifigen Struktur (z. B. sehr deutlich bei *c*, *B* und *d*, *A*).

Die Annahme grenzt also an Sicherheit, daß eine ebenfalls temporäre cytoplasmatische Verbindung der Partner vom Ento- und Ektoplasma des einen über die „Brücke“ zum Ekto- und Entoplasma des anderen, also von Ento- zu Entoplasma besteht. Die viele Kerne führenden kugeligen Entoplasmaanteile der beiden *Actinosphaerien* („polyenergide“ Zellen) stehen also für einige Minuten durch eine lebende Cytoplasma-  
brücke miteinander in Verbindung.

## Zusammenfassung über die Einstellung 50

(Abb. 11, a—l und 12, a—l)

Bei der Untersuchung der mit Hilfe des Zeitrafferfilms erstmalig bei *Heliozoen* festgestellten temporären „Plasmabrücken“ zwischen zwei *Actinosphaerien* entsteht zunächst die Frage nach der Herkunft des die Verbindung aufbauenden Protoplasmamaterials. Teilbild g der Abb. 12 zeigt sehr deutlich, daß in der ehemaligen „Brückenzone“ zwischen A und B keine Axopodien im Bereiche der Abbildungsschärfe vorhanden sind (nach Auflösung der „Brücke“). Da auch bei der Nahrungsaufnahme Axopodienmaterial verflüssigt wird, zur Umhüllung des Beuteobjektes, könnte man annehmen, daß das gesamte Protoplasma, das in die temporäre „Brücke“ eingeht, ebenfalls aus den mehr oder weniger verflüssigten Axopodien in der Berührungszone besteht, und daß die unter Zeitraffung sichtbar werdenden lebhaften Bewegungen in dieser Zone eine Summierung der Bewegungsanteile der einzelnen Axopodien darstellen, die zur „Brücke“ mehr oder weniger verschmolzen sind. Die Masse der beiden halbkugligen Vorwölbungen außerhalb des Ektoplasma, die die Endphase der temporären Verbindung darstellen, ist zweifellos wesentlich größer als die durch die „Einschmelzung“ von Axopodien in der Berührungszone zustande kommende Plasmamenge.

Im einzelnen wird der Vorgang der engen Annäherung zweier Partner wahrscheinlich folgendermaßen vor sich gehen, wobei auf die Analyse der Ortsbewegung der *Actinosphaerien* hingewiesen sei (s. W. Kuhl 1951).

Im Falle der Einstellung 50 ist A relativ „ortsfest“; jedenfalls nähert sich C aktiv A. Die Axopodien müßten eigentlich infolge ihrer Starrheit und Elastizität eine direkte Näherung zweier Tiere bis zur Berührung verhindern. Die Annäherung erfolgt jedoch (unter Zeitraffung betrachtet) mit einer derart gleichförmigen Geschwindigkeit, als ob überhaupt keine radiär eingestellten starr-elastischen Axopodien vorhanden wären!

Eine Biegung von Axopodien, die sogar zu einer scharfen Knickung führen kann, kommt dann zustande, wenn ein sich aktiv bewegendes Tier an einem in Ruhe verharrenden oder sich wesentlich langsamer bewegendem *Actinosphaerium* vorbeigleitet; hierbei werden die sich berührenden Axopodien wie Florettlingen durchgebogen. Aus den bisher ausgewerteten Einstellungen kann die Folgerung gezogen werden, daß mehrere Verhaltenstypen nachweisbar sind:

1. Zwei *Actinosphaerien* nähern sich, oder ein Tier nähert sich einem in Ruhe befindlichen mit völlig gleichbleibender Geschwindigkeit. Ohne Stockung kommt es zur Berührung und zur Verschmelzung mit nachfolgender Abkugelung: Plasmogamie. Es können u. U. Tiere in verschiedener physiologischer Phase (= „Stimmung“) in dieser Weise miteinander verschmelzen, z. B. ein vor der Encystierung stehendes Tier mit undurchsichtigem Entoplasma mit einem „normalen“ *Actinosphaerium*. Es tritt keine Verbiegung oder Knickung von Axopodien in der Berührungszone ein.



Wesentlich und charakteristisch ist der kontinuierlich ablaufende Vorgang (Abb. 4).

2. Zwei *Actinosphaerien*, oder auch drei und mehr, nähern sich bis auf wenige Mikron, entfernen sich voneinander um etwa die Höhe des Ektoplasma (etwa  $30\ \mu$ ), nähern sich zum zweiten Male, entfernen sich wiederum usw. Im Mikrozeitraffer-Laufbild wird zwischen den „Partnern“ eine lebhaft bewegliche, unregelmäßig gestaltete Plasmamasse sichtbar; in der Näherungszone treten mehr oder weniger tiefe Eindellungen auf. Allmählich wird die Plasmamasse zwischen den Partnern kompakter, besonders an den der Oberfläche der Tiere nahe liegenden Teilen. Diese Regionen können halbkugelige Gestalt annehmen. Die schmale Mittelzone der Plasmamasse zwischen den Partnern bewegt sich (im Zeitrafferlaufbild) am lebhaftesten, ist daher auf den Teilbildern meist unscharf abgebildet. Der Abstand der „Partner“ wird auf dieser Phase meist auf  $150\ \mu$  vergrößert. Die Eindellungen in der „aktiven“ Zone dauern an. Wir bezeichnen diese temporäre plasmatische Verbindung zwischen den Tieren zunächst mit dem keine funktionelle Deutung vorwegnehmenden Ausdruck „Brücke“. Nach einigen Minuten weicht der Plasmafaden in der Mitte aktiv auseinander; hierdurch entstehen halbkugelige oder kegelförmige „Restkörper“, die allmählich vom Ektoplasma aufgenommen und in das Entoplasma — ähnlich wie bei Beuteobjekt — überführt werden.

Was nun innerhalb der lebhaft beweglichen „Brückenzone“ wirklich vor sich geht, ist auf Grund der Lebendbeobachtung nicht zu entscheiden. Die Nachkriegsverhältnisse verhinderten eine cytologische Untersuchung der „Brücken“ am fixierten und gefärbten Material, die allein darüber Aufschluß geben könnte, ob gegebenenfalls Kerne bei diesen interessanten Vorgängen irgendeine Rolle spielen (*Actinosphaerium* ist bei Frankfurt sehr selten!).

5. Zwei oder mehr *Actinosphaerien* nähern sich aktiv, oder ein Tier nähert sich aktiv einem stillliegenden. Es kommt zur Bildung von Eindellungen, unklaren lebhaften Plasmabewegungen (unter Zeitraffung) zwischen den sehr nahe beieinander liegenden „Partnern“, wilden Kreuzungen der Axopodien in der Zone der größten Annäherung, aber es wird keine „Plasmabrücke“ ausgebildet, sondern es erfolgt eine baldige Trennung der Tiere. Die Axopodien — dies ist von Bedeutung — sind von Anfang an in der Näherungszone in „Unordnung“. Dieses Verhalten der Axopodien, schon bevor sich die Tiere maximal genähert haben, läßt die bestimmte Voraussage zu, daß weder eine Plasmogamie noch eine „Brückenbildung“ eintreten wird.

Es ist also von Anfang an eine „Phobie“ der Tiere zu erkennen.

Die temporäre Bildung von „Plasmabrücken“ zwischen zwei *Actinosphaerien* kann, wie Abb. 13, a—f darlegt, auch unter Erscheinungen ablaufen, die sowohl zeitlich wie auch mikrodynamisch von den Beobachtungen der Einstellung 50 (Abb. 11 und 12) abweichen.

Einstellung 45, Abb. 13, Teilbild a zeigt die Annäherung zweier kleiner *Actinosphaerien* (A:  $160\ \mu$ , B:  $150\ \mu$  Durchmesser), die durchaus nicht unge-

wöhnlich erscheint. *B* weist eine sehr schwache Eindellung auf, *A* eine schwache Abflachung. Nach 3<sup>m</sup> 33<sup>s</sup> (Teilbild *b*) ist bei *A* eine 19  $\mu$ , bei *B* nur 9  $\mu$  tiefe Eindellung vorhanden, die durch eine unregelmäßig gestaltete Plasmamasse, die einen gebogenen Verlauf zeigt, verbunden sind. *A* und *B* sind derart gegeneinander gedreht, daß die Eindellungen nicht mehr gegen-

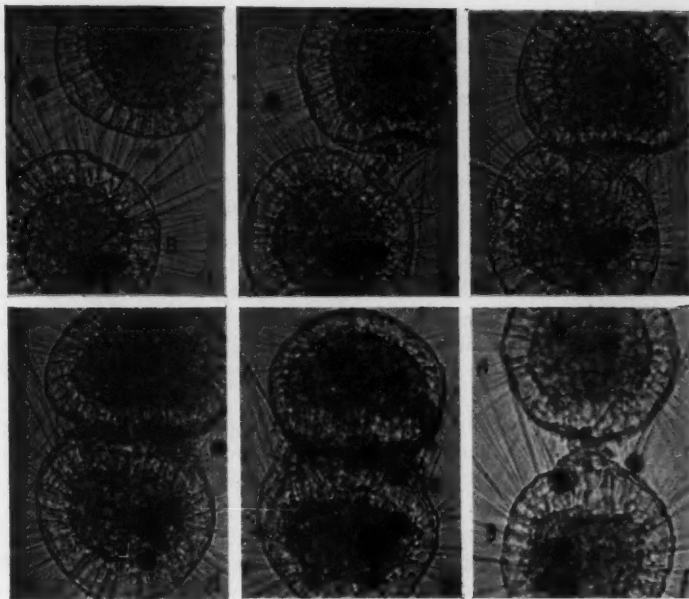


Abb. 13 (Einstellung 45): Sechs Phasen zweier *Actinosphaerien* beim Versuch einer temporären Brückenbildung, der in phobisches Verhalten übergeht: *b*, *c*, *d*, *e*: Erweckt den Eindruck eines versuchten Kannibalismus (sehr gestörte Ektoplasmastruktur in der im Zeitrasterlaufbild sehr lebhaft Bewegungen zeigenden Berührungszone). *f*: Beide „Partner“ in lebhafter Bewegung, vor allem der unklar strukturierte Plasmarest in der ehemaligen Berührungszone (Teilbild infolge dieser Bewegung etwas unscharf). Die Tiere trennen sich schließlich. Das Verhalten in dieser Einstellung kann zunächst noch nicht befriedigend gedeutet werden. Teilstrich = 0,1 mm. Zeitangaben im Text.

über liegen. Links von der offenbar im Entstehen befindlichen „Plasma-  
brücke“ berühren sich *A* und *B* nahezu, während rechts die Endpunkte der  
Eindellungen einen Abstand von 56  $\mu$  aufweisen. Links ist die normale  
Stellung der Axopodien unverändert, rechts hingegen findet man ein  
wirres Durcheinander von Kreuzungen, Verbiegungen und  
Verklebungen. 5<sup>m</sup> 30<sup>s</sup> später ergibt sich das durch Teilbild *c* erläuterte  
Verhalten (9<sup>m</sup> 7<sup>s</sup> seit *a*). Die Tiere haben sich wieder etwas aufeinander zu  
gedreht. Links berührt das Ektoplasma von *A* direkt die Rindenschicht

von *B*. Die Eindellungen erscheinen wesentlich flacher. Infolge der Rückdrehung der Tiere ist die im Zeitrafferlaufbild lebhaft bewegliche freie Plasmamasse zwischen den Tieren in dem nach rechts offenen Winkel der Berührungszone zusammengedrängt und „verdichtet“ worden. Im Ektoplasma beider Tiere treten Störungen der grobvakuolisierten Strukturen auf. Teilbild *d* der Abb. 13 wurde 7<sup>m</sup> 18<sup>s</sup> später als *c* aufgenommen (16<sup>m</sup> 17<sup>s</sup> seit *a*). Eine völlige Rückdrehung von *A* und *B* hat eine Berührung der „Partner“ in einer Breite von 163  $\mu$  zur Folge. Die Berührungszone erscheint dunkel infolge des hier „konzentrierten“ Plasma, das aus den „eingeschmolzenen“ Axopodien hervorgegangen ist. Die Konture von *A* und *B* sind in der „Verlötungszone“ nicht mehr scharf zu erkennen; seitlich sieht man durchscheinenderes, im Zeitrafferlaufbild lebhaft bewegliches Protoplasma. Die Gestalt beider „Partner“, besonders von *A*, ist stark gegenüber *c* verändert, und zwar im Sinne einer Abplattung der Kugel.

In der Phase *d* ist eine Voraussage über das weitere Verhalten schwierig. Eine „freie Brücke“ wie in Einstellung 50, Abb. 11 und 12, liegt nicht vor, da das typische Auseinanderweichen der Tiere nach Herstellung der ersten Verbindung durch „eingeschmolzene“ Axopodien nicht erfolgt ist. Eine Plasmogamie wird nicht zustande kommen (vgl. Abb. 3 und 10), sie ist in ihren einleitenden Phasen nie mit derartigen Gestaltänderungen des Zellkörpers verbunden, auch ist die Masse des aus mehr oder weniger verflüssigten Axopodien entstandenen „Verlötungsplasma“ zwischen den Partnern nicht derart umfangreich bei einer beginnenden Plasmogamie. Somit bliebe noch die Deutung dieser Phase als „kannibalistischer Versuch“, bei dem offenbar *A* als der aktive Teil anzusehen wäre.

Dieser Zustand der breiten, engen Berührung von *A* und *B* dauert insgesamt 27<sup>m</sup> 29<sup>s</sup>! Eine Phase maximal enger Berührung zeigt Teilbild *e*, 14<sup>m</sup> 36<sup>s</sup> später als *d* aufgenommen (30<sup>m</sup> 53<sup>s</sup> seit *a*). Beide Tiere haben jetzt ungefähr das gleiche Aussehen. Auffallend ist die ungewöhnliche Höhe des Ektoplasma in der Berührungszone; es mißt bei *A* und *B* etwa 46  $\mu$  (an den entgegengesetzten Polen nur 23  $\mu$  bei *A* und 32  $\mu$  bei *B*). In der „Furche“ zwischen den „Partnern“ kreuzen sich die Axopodien in ungeordneter Weise. 9<sup>m</sup> 36<sup>s</sup> nach Teilbild *e* wird die breite Verbindung innerhalb einer halben Minute gelöst, aber es bleibt eine 48  $\mu$  breite, sehr bewegliche „Plasmabrücke“ bestehen; die Tiere sind um den Betrag von 36  $\mu$  auseinandergegangen. *A* hat wieder fast normale Gestalt, bei *B* ist das Ektoplasma in der Berührungszone noch erhöht. Auch die Axopodien weisen nahezu wieder normale Anordnung auf. 40<sup>m</sup> 34<sup>s</sup> sind nunmehr seit *a* vergangen.

Diese nach dem Auseinanderweichen von *A* und *B* sichtbar werdende „Plasmabrücke“ zeigt im Zeitrafferlaufbild eine derart lebhafte, hin und her wogende Beweglichkeit, daß sie auf sämtlichen Teilbildern unscharf abgebildet wird. Dieser Zustand hält nun noch 20<sup>m</sup> 33<sup>s</sup> an, ohne daß große Veränderungen an den *Actinosphaerien* sichtbar werden. Die Plasmaverbindung ändert ununterbrochen ihre Form, zeigt Verdickungen und Vorwölbungen, die ständig hin und her wogen.

Teilbild *f* der Abb. 13, das letzte der Einstellung 45, vermittelt einen Eindruck der plasmatischen Verbindung 61<sup>m</sup> 7<sup>s</sup> nach Teilbild *a*. (Die Trennung von *A* und *B* wurde nicht mehr aufgenommen, jedoch subjektiv beobachtet.) Die wieder normale Stellung der Axopodien berechnete zu der Voraussage, daß bald eine völlige Trennung eintreten würde.

#### Zusammenfassung über die Einstellung 45 (Abb. 13)

Es liegen bisher noch viel zu wenige unter Änderung des Zeitfaktors gewonnene Beobachtungen über das mikrodynamische Verhalten von *Actinosphaerium* vor, um zu einer einwandfreien Deutung der Einstellung 45 zu gelangen. Auch die Anwendung des etwas vagen, der Tierpsychologie entnommenen Begriffes der „Stimmung“ führt zunächst zu keinen greifbaren Vorstellungen, wenigstens nicht in diesem, offenbar recht verwickelten Falle, denn die „Stimmung“, die das Verhalten auslösen soll, ist den Einzellern cytologisch im Leben durchaus nicht immer anzumerken. So wissen wir auf Grund der Anwendung des Mikrozeitrafferfilms, daß aus dem Verhalten der Axopodien bei der Annäherung der Tiere auf das Zustandekommen einer Plasmogamie mit großer Sicherheit geschlossen werden kann.

Hier aber deutet das Verhalten der Axopodien (*b*) auf eine phobische Verhaltensweise, es erfolgt eine Drehbewegung der Partner gegeneinander, als ob die Tiere aneinander vorbeizustreichen begännen, und trotzdem wird eine lockere Plasmabrücke gebildet, neben der die Tiere sich direkt berühren. Dann erfolgt eine Rückdrehung (*c*), verbunden mit einer offenbar kräftigen, aktiven Zusammenpressung, durch die ein „Auseinanderquetschen“ des Plasmamaterials der anfänglich gebildeten, schief eingestellten „Brücke“ bewirkt wird (*d*, *e*). Dieser Zustand dauert ungewöhnlich lange, fast eine halbe Stunde, hat starke Struktur- und Dickenänderungen des Ektoplasma in der breiten Kontaktzone zur Folge, wobei streifige Strukturen parallel der Längsachse des „Doppeltieres“ vorherrschen und keine scharfe Abgrenzung des Ektoplasma gegen das Entoplasma zu beobachten ist. Beachtlich ist nun, daß die etwa 122  $\mu$  breite Kontaktzone innerhalb einer halben Minute gelöst wird und wieder eine „Plasmabrücke“ auftritt, die bis zum Ende der Filmaufnahme (20<sup>m</sup> 33<sup>s</sup>) anhält und später gelöst wird. Der merkwürdige Gesamtvorgang kann demnach in folgende Abschnitte gegliedert werden:

Annäherung — große Eindellung bei *A*, kleine bei *B* (außerhalb der Verbindungslinie der Mittelpunkte der Tiere) — Bildung einer lebhaft beweglichen „Plasmabrücke“ — einseitiger Kontakt von *A* und *B* neben der „Brücke“ — Drehung von *A* und *B* gegeneinander bis zur breiten Berührung unter Zusammenpressung des „Brückenplasma“ in der Kontaktzone — Lösung des Kontaktes und Auseinanderweichen — neues Sichtbarwerden des ersten „Brückenmaterials“ in Gestalt einer sehr beweglichen Plasmaverbindung — Trennung der Tiere.

Von besonderem Interesse ist die 27,5<sup>m</sup> dauernde aktive Zusammenpressung der „Partner“; kann sie gedeutet werden?

Die wirre Stellung der Axopodien trägt durchaus phobischen Charakter, und man kann geneigt sein anzunehmen, daß vielleicht ein Versuch zu kannibalischem Verhalten vorliegt. Da beide Tiere die gleichen Form- und Strukturverhältnisse aufzuweisen scheinen (e), ist es schwierig festzustellen, von welchem „Partner“ die „Freßtendenz“ ausgeht oder ob gar zufällig bei beiden die gleiche physiologische Phase vorliegt. Dieses erscheint jedoch unwahrscheinlich und in der Auswirkung kaum vorstellbar. Jedenfalls kam der „kannibalistische“ Versuch zur Durchführung; es trat schließlich eine Trennung ein, bei der noch sehr lange stark metaboles Plasma im erweiterten Raum zwischen den Tieren sein noch ungeklärtes Bewegungsspiel trieb, ohne jedoch den gleichen Habitus aufzuweisen wie die in Einstellung 50 (Abb. 11 und Abb. 12) dargestellten „temporären Brückenbildungen“. Leider konnte das Schicksal das offenbar aus „eingeschmolzenen“ Axopodien herstellenden Plasmamaterials nicht weiter verfolgt werden. Die völlig unregelmäßige, stets wechselnde Gestalt dieser „Verbindung“ läßt die Vermutung zu, daß eine andersartige Trennungsart stattgefunden hat als bei den Tieren der Einstellung 50.

Ein Verhalten zweier *Actinosphaerien* wie in Einstellung 45 wurde nur einmal beobachtet; betont sei, daß man zu Beginn einer Mikrozeitraster-Filmaufnahme ja nur selten mit Sicherheit voraussehen kann, wie die Vorgänge wirklich ablaufen werden. Bemerkungen über den „Kannibalismus“ bei *Heliozoen* finden sich gelegentlich im Schrifttum, jedoch fehlen Abbildungen oder genauere Angaben. Von „Kannibalismus“ kann eigentlich nur dann gesprochen werden, wenn der Größenunterschied der Tiere derart ausgeprägt ist, daß das als Beutetier in Frage kommende Objekt um so viel kleiner ist als der „Räuber“, daß es vollkommen von einer Nahrungsvakuole eingeschlossen werden kann. Bei unserem reichhaltigen Material wurde nie „Kannibalismus“ beobachtet, wohl wegen ausreichender Ernährung normaler Art; auch fehlten im Zuchtbecken Artgenossen, die größtenteils in Betracht kamen. Selbst die kleinsten *Actinosphaerien* wären immer noch für „kannibalistische Akte“ zu groß gewesen. Das hindert nicht, in den Anfangsphasen der Einstellung 45 einen „kannibalistischen“ Versuch am ungeeigneten Objekt zu sehen.

## VII. Aneinander-Vorbeigleiten ohne „Brückenbildung“ unter Verbiegung der Axopodien: „Phobie“

Es wurde bereits mehrfach betont, daß zum Verständnis des normalen Verhaltens von *Actinosphaerium* verschiedene, physiologisch bedingte, vorläufig kausal noch kaum verständliche „Stimmungen“ anzunehmen sind. Die nachstehend gegebenen Teilbilder der Einstellung 49 zeigen ein unverkennbar phobisches Verhalten.

An mehreren Beispielen konnte nachgewiesen werden, daß eine Plasmogamie — nach Annäherung zweier Tiere — mit großer Sicherheit zu erwarten ist, wenn die Axopodien ihren normalen Habitus beibehalten und keine Verbiegungen aufweisen. Eine gleichförmige Geschwindigkeit



keit charakterisiert die sich nähernden Tiere, und sie verhalten sich so, als ob überhaupt keine starren Axopodien igelartig nach allen Seiten sich ihnen entgegenstreckten.

Aus Teilbild a der Abb. 14 der Einstellung 49 geht bereits das phobische Verhalten zwischen A und B, auch für den weniger geübten Beobachter, deutlich hervor: die Axopodien in der Zone größter Nähe

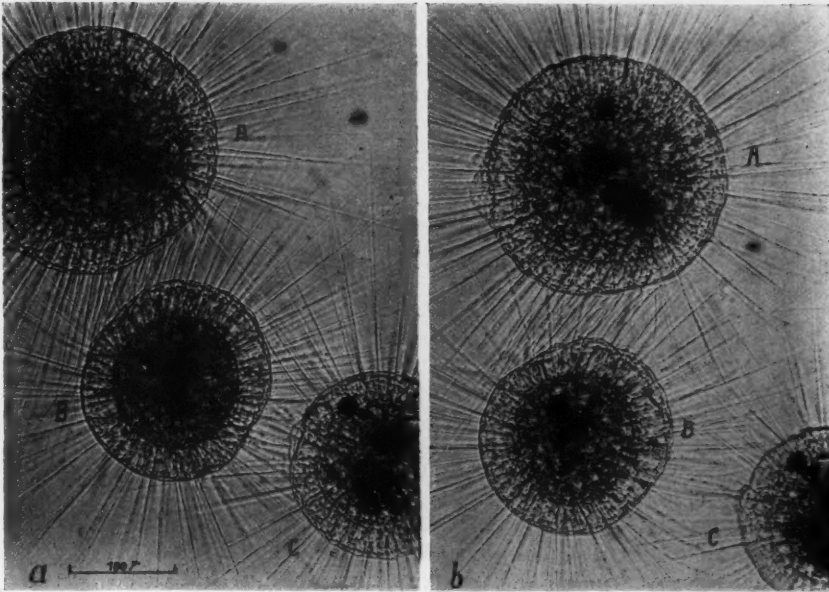


Abb. 14 (Einstellung 49): Phobisches Verhalten zweier *Actinosphaerien* A und B. Relativ schnelle Bewegung. Aneinander-Vorbeistreifen unter starker Verbiegung der Axopodien; keine Überführung von Axopodien in den Solzustand in der Zone größter Annäherung. Das hinzukommende C weist in b ebenfalls ein leicht phobisches Verhalten auf, das jedoch nicht über die Verbiegung einiger Axopodien hinausgeht. Teilstrich = 0,1 mm. Zeitangaben im Text.

sind nicht radiär, sondern beinahe tangential eingestellt. A (Durchmesser:  $200\mu$ ) bewegt sich nach rechts oben, B (Durchmesser:  $160\mu$ ) nach links unten. In der Annäherungszone liegen die Axopodien von A denen von B genau parallel; sie streichen aneinander vorbei, berühren sich und die Körperoberfläche des „Partners“, wobei sie, wie schleifende Kontaktfedern, leicht abgelenkt werden. Alle drei Tiere zeigen sehr lange Axopodien, die bei den kleineren *Actinosphaerien* B und C wesentlich länger sind als der Körperdurchmesser. Zwischen B und C erscheint eine „Brückenbildung“ möglich. C weist in der Annäherungszone die typische leichte

Eindellung auf (vgl. die Einstellungen 50 und 45, Abb. 11, 12 und 13). *B* ist ebenfalls in dieser Zone leicht abgeflacht, desgleichen auf der anderen Seite *A* gegenüber. Auch *A* erscheint *B* gegenüber an der Stelle leicht abgeplattet, an der die parallel liegenden Axopodien von *B* an seiner Körperoberfläche entlang streichen. (Vergleich: Man führt zwei Bürsten mit den Borstenseiten derart aneinander vorbei, daß sich die Borsten untereinander „verzahnen“.)

In Teilbild *b* (52<sup>s</sup> seit *a*) ist die Lage der Tiere untereinander nicht erheblich verändert. Die Abstände von *A* zu *B* und *B* zu *C* sind größer geworden. Zwischen *B* und *C* sind keine Anzeichen einer temporären „Brückenbildung“ mehr vorhanden; im Gegenteil, die leicht gebogenen Axopodien von *B* und *C* in der Zone der Annäherung sind ein Zeichen beginnender „Phobie“. Die Stellung der Axopodien zwischen *A* und *B* ist seit *a* kaum verändert.

Folgerungen: Bei *Actinosphaerien*, die sich einander bis zur Kreuzung der Axopodien aktiv genähert haben oder die durch die Strömungen im Wasser passiv bis zu diesem Grade der Annäherung getrieben wurden, entscheidet es sich in etwa 1<sup>m</sup>, ob sichere Kennzeichen einer beginnenden Plasmogamie sichtbar werden, ob eine temporäre „Brückenbildung“ zu erwarten ist oder ob ein phobisches Verhalten eintritt. Zwischen *B* und *C* liegen in Teilbild *a* vortastende Versuche einer Annäherung in Gestalt der ersten Anzeichen einer „Plasmabrücke“ vor (Eindellungen und beginnende „Einschmelzung“ einiger Axopodien); diese Anzeichen verschwinden jedoch wieder. Über die inneren Ursachen des „ablehnenden“, phobischen Verhaltens von *A* und *B* und über die physiologische Bedingtheit des Geschehens ist noch nichts Sicheres auszusagen. Die beträchtlichen Größenunterschiede zwischen den langsam aneinander vorbeistreichenden „Partnern“ *A* und *B* dürfen wohl kaum für das Nichtzustandekommen einer Plasmogamie verantwortlich gemacht werden, denn es wurden sehr oft Verschmelzungen von wesentlich größeren Tieren mit erheblich kleineren beobachtet.

### VIII. Beobachtungen an encystierten Tieren

Aus äußeren Gründen konnten die Encystierung und der Zerfall in Tochtercysten sowie die gesamten Vorgänge der Autogamie noch nicht unter Änderung des Zeitmomentes, im Sinne einer Zeitraffung, genauer untersucht werden. Es soll daher hier lediglich eine mikrodynamische Beobachtung Erwähnung finden, die sich bei der Analyse der Einstellung 63 ergab (s. W. Kuhl 1951; Abb. 2 [Einstellung 63]).

Einige Stunden nach Teilbild *d* dieser Einstellung sind zwei große Aggregate abgekugelt; es liegen deutliche Anzeichen der beginnenden Umformung zum Ruhestadium, der Cyste, vor. Cytologische Einzelheiten während der Encystierungsphase sind wegen der schwachen Vergrößerung der Übersichtsaufnahme leider nicht zu erkennen.

Bemerkenswert ist die im Zeitrafferlaufbild in Erscheinung tretende Tatsache, daß der dunkle Inhalt der Cyste langsam rotiert! Auf

welche Weise beim Fehlen jeglicher Bewegungsorganelle eine derartige, subjektiv nicht sichtbare Rotation zustande kommen kann, ist noch völlig ungeklärt. Es ist daher müßig, spekulative Betrachtungen über Ursache und Bedeutung dieses (durch den Zeitrafferfilm sichtbar gemachten) Vorganges anzustellen, ehe diese nur bisher in wenigen Fällen beobachtete bemerkenswerte Bewegung des Cysteninhaltes an größerem Beobachtungsmaterial unter stärkerer Vergrößerung in Zeitrafferfilm-Aufnahmen vorliegt.

### IX. Bemerkungen über den „Individualbegriff“ und die verschiedenen Altersstufen bei *Actinosphaerium eichhorni* Ehrbg.

Bei Einzellern, die in ihren Lebenszyklus Totalverschmelzungen, Plasmogamien, einschalten, ist der „Individualbegriff“ mit besonderer Vorsicht anzuwenden. Das Vorhandensein zahlreicher Kerne erschwert in erheblichem Maße die Feststellung, wann von einem „Individuum“, einem „Unteilbaren“ gesprochen werden kann. Der für derartige vielkernige Protozoen geprägte Begriff der „polyenergiden“ Zelle erleichtert in keiner Weise die Sachlage. Zum „Nichtteilbaren“ müßte der Begriff des „Nicht-hinzufügbaren“ (durch Verschmelzung) bei derartigen Formen geprägt werden, was aber bei der geringen Anzahl solcher Vertreter der Rhizopoden nicht lohnte.

Jedes *Actinosphaerium*, dessen Vorgeschichte nicht genau bekannt ist, läßt die berechnete Frage aufwerfen: „Wie viele Plasmogamien und Trennungen hat dieses Tier bereits durchgemacht? Hat man zwei durch einen dünnen Protoplasmafaden noch in Verbindung stehende Tiere vor sich, so ist zunächst nicht zu entscheiden, ob eine Trennung nach einer Plasmogamie oder eine „Plasmotomie“ oder eine „Teilung“ vorliegt. Das Verhalten der zahlreichen Kerne (bis zu 200) ist am lebenden Objekt nicht genau zu beobachten infolge der mehr oder weniger großen Undurchsichtigkeit des Entoplasma. Die Anwendung von Färbemethoden lag nicht im Bereich des Themas dieser Arbeit. Fixierung und Färbung hätte planmäßig sämtliche hier unter Zeitraffung untersuchten Lebensphasen zu

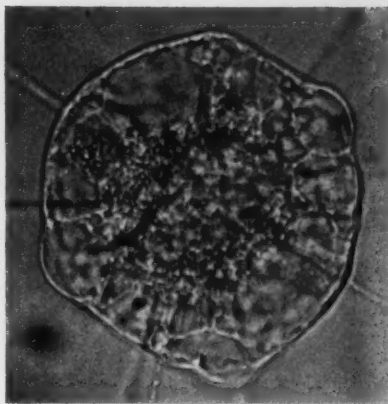


Abb. 15 (Einstellung 78). „Junges“ *Actinosphaerium* mit sehr hohem Ektoplasma und nur wenigen Flüssigkeitsalveolen. Relativ schnelle Bewegung unter Zeitraffung, geringe Anzahl der Axopodien. Ortsbewegung kann während der Entleerung einer kontraktilen Vakuole aufhören.

erfassen; es bleibt fraglich, ob wesentliche Ergebnisse dadurch erzielt würden, abgesehen von den Vorgängen bei den „temporären Plasma-  
brücken“. Mit Sicherheit kann behauptet werden, daß junge, durch  
Autogamie entstandene *Actinosphaerien*, aus Cysten geschlüpfte Tiere, an  
ihrer geringen Größe und Kernarmut erkannt werden können. Desgleichen  
kann das in Abb. 15 dargestellte Tier als jung bezeichnet werden. Sein  
Ektoplasma ist relativ sehr hoch und mißt etwa die Hälfte des Durch-  
messers des Entoplasma. Typisch ist die außerordentliche Größe der we-  
nigen, das Ektoplasma zusammensetzenden Flüssigkeitsalveolen und die

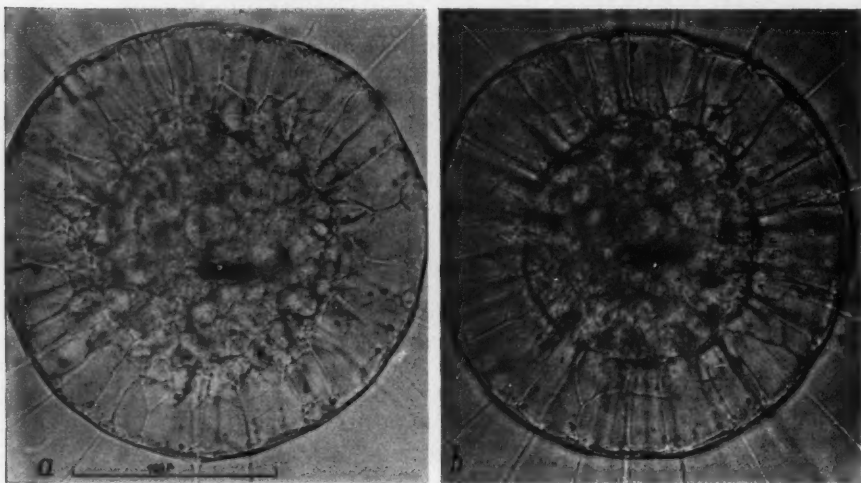


Abb. 16 (Einstellung 61). Etwas älteres *Actinosphaerium* als in Abb. 15. Zwei ver-  
schieden hohe Einstellungen. Relativ sehr hohes Ektoplasma mit vorwiegend  
radiär eingestellten Alveolenwänden. Teilstrich = 0,1 mm.

geringe Zahl der Axopodien. In einigen Ektoplasmaalveolen zeigten in  
der Flüssigkeit suspendierte Granula subjektiv sichtbare Brownsche  
Bewegung (s. die große Alveole links oben). *Actinosphaerien* dieser Größe  
bewegen sich relativ schnell (unter Zeitraffung beobachtet); während der  
Entleerung einer pulsierenden Vakuole kann die Ortsbewegung aufhören.

Abb. 16, a und b zeigt ein offenbar etwas älteres Tier von 209  $\mu$  Durch-  
messer und einer noch relativ großen Höhe des Ektoplasma von 47  $\mu$ . Die  
Dicke der „Rindenschicht“ ist nur 10  $\mu$  geringer als der Radius des Ento-  
plasma. Teilbild a läßt die Zusammenfügung der Flüssigkeitsalveolen im  
Ektoplasma gut beobachten; viele Alveolen reichen durch das gesamte  
Ektoplasma. Die Dicke der plasmatischen Zwischen- (Doppel-) Wände  
beträgt etwa 1  $\mu$ ; die Breite der ektoplasmatischen Alveolen schwankt im  
Bereiche von 18 bis 36  $\mu$ . Als weiteres Merkmal für ein junges Tier ist die  
geringe Zahl der Axopodien anzuführen. Ob die undeutliche Abgrenzung

des Ektoplasma gegen das Entoplasma die Folge einer nicht völlig genauen Einstellung auf den optischen Schnitt oder strukturell bedingt ist, läßt sich nicht mit Sicherheit sagen. Teilbild *b* (36<sup>m</sup> 24<sup>s</sup> später als *a*) bietet den normalen Eindruck. Das Tier zeigt jetzt (unter Zeitraffung) keine Eigenbewegung mehr.

Zur Klärung der Frage einer genauen Definition der „Altersstufen“ von *Actinosphaerium* und einer schärferen Umgrenzung des hier so sehr schwankenden „Individualbegriffes“ ist die „Graphische Form- und Korrelationsanalyse“ (W. Kuhl) anzuwenden. In den Abb. 1 und 2 wurde an dem in dieser Arbeit verwandten Material bereits ein erster Versuch in diesem Sinne angestellt. Es fehlen jedoch noch Angaben über die Anzahl der Kerne, der Axopodien und der pulsierenden Vakuolen, Merkmale, die bei einer derartigen Korrelationsuntersuchung unbedingt zu berücksichtigen sind. Jedes Objekt einer solchen Analyse müßte lebend und fixiert und gefärbt untersucht werden. Es kann an dieser Stelle nur die Anregung hierzu gegeben bzw. auf eine spätere Abhandlung vertröstet werden. Diese vorgeschlagene „Form- und Korrelationsanalyse“ würde wahrscheinlich auch unsere Kenntnis der Verhaltensweisen dieser Heliozoengattung erheblich erweitern und vielleicht eine genauere Voraussage des jeweiligen Verhaltens, z. B. einer Plasmogamie, Trennung oder echten Teilung ermöglichen. An einem umfangreichen Material müßten Gesetzmäßigkeiten zwischen Zellgröße, relativer Höhe des Ektoplasma, Grad der Vakuolisierung des Ektoplasma, Anzahl der kontraktile Vakuolen, Anzahl der Kerne und Ernährungszustand (Nahrungsvakuolen) und dem Verhalten der Tiere mit Hilfe der oben erwähnten Methode in exakter Weise aufgedeckt werden; nur auf diese Weise kann Klarheit geschaffen werden über die jeweilige „Stimmung“, im Sinne der Verhaltenslehre, dieses *Heliozoon*, die es einmal zur sofortigen Plasmogamie führt, ein anderes Mal eine temporäre „Plasmabrücke“ zustande kommen oder es mit deutlichen Anzeichen einer „Phobie“ dicht an einem anderen Tier vorbeistreichen läßt. Aus den Maßverhältnissen und cytologischen Daten eines Tieres wird schließlich die Schlußfolgerung möglich sein, ob Plasmogamien vorausgegangen sind. Diese sind keineswegs immer „Freßgemeinschaften“ zur Bewältigung besonders großer Beuteobjekte noch allein durch Hunger bedingte Verhaltensweisen. Gleich große Tiere vereinigen sich ebenso leicht wie ein großer und ein kleiner Partner; die Zellgröße scheint demnach für das Zustandekommen dieses so auffallenden Vorganges nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Die Plasmogamien vereiteln es, ein einzelnes Tier in eine normale, durch Nahrungsaufnahme bedingte Wachstumsreihe einzuordnen; Trennungen stören von neuem die infolge der Plasmogamien eingetretenen Größenverhältnisse. Es kann demnach der Begriff „Individuum“ bei *Actinosphaerium* und verwandten Formen, die ebenfalls Plasmogamien aufweisen, bestenfalls folgendermaßen gefaßt werden:

Nur Tiere, die nachweislich noch keine Plasmogamie durchgemacht haben und nicht durch Trennung aus einem anderen Tier hervor-



gegangen sind, und solche, die einer echten Teilung entstammen und noch mit keinem anderen Tier verschmolzen sind, können als Individuum im üblichen Sinne angesprochen werden. Es ist zu erwarten, daß die Untersuchung der Kernverhältnisse eine weitere Klärung in dieser Hinsicht bringen wird. Die Bezeichnung „polyenergide Zelle“ ist im Hinblick auf die Vielzahl der Kerne gebildet worden; die Plasmogamien führen stets zu einer erheblichen Vermehrung, die Trennungen zu einer Verminderung der Kernzahl; so ist die Größe der Zelle von *Actinosphaerium* einem ständigen Wechsel unterworfen, der der Beobachtung nicht ohne weiteres zugänglich ist.

Dem Untersucher, der nur subjektive Beobachtungen anstellt, kommen immer nur **Phasen** einer „**Pseudoindividualität**“ zu Gesicht. Erst die langfristige Mikrozeitraffer-Filmaufnahme einer kleinen oder größeren Population vermag diesen steten Wechsel bis zu einem gewissen Grade aufzudecken; er wird dadurch der exakt messenden Laufbild- und Teilbildanalyse zugänglich.

### X. Zusammenfassung

1. Mit Hilfe des Zeitrafferfilms wird die Plasmogamie zwischen zwei und mehreren Partnern und die Trennung von zwei Partnern mikrodynamisch genau untersucht. Plasmogamien waren sehr häufig, ohne daß Beuteobjekte in der Nähe lagen. Bis jetzt ist keine erkennbare Ursache für die Verschmelzung ganzer „Pseudoindividuen“ bekannt.

2. Die Axopodien in der Nähe der Berührungszone bleiben bei der Plasmogamie völlig gerade. Drei Phasen der Plasmogamie: a) Einschmelzen der Axopodien in der Kontaktzone und Überführung des alveolären Ektoplasma in dieser Region in flüssigeren Zustand. b) Verschmelzung der Entoplasmaanteile der Partner (zunächst nur schmaler Verbindungsstrang). c) In der ringförmigen Berührungszone wird eine enge Verbindung der grobvakuolisierten Ektoplasmaanteile der Partner hergestellt, verbunden mit „Einschmelzung“, Umordnung und Neubildung von Alveolarwänden. In 50<sup>m</sup> ist die ellipsoide Gestalt des Doppeltieres hergestellt.

3. Eine Plasmogamie kommt auch zustande, wenn der eine Partner ein lokalisiert stark „aufgeblähtes“ Ektoplasma aufweist. Die „Blase“ wird (in diesem Sonderfall) vor der Vereinigung entleert.

4. Bei gleichzeitiger Plasmogamie zwischen drei Partnern treten gleichsinnige Drehbewegungen auf, die die Vereinigung offenbar erleichtern.

5. In „Populationen“ von *Actinosphaerium*, in denen zahlreiche Plasmogamien vorkommen, findet sich auch immer ein hoher Prozentsatz von Trennungen. Der „Individualbegriff“ ist hier völlig verwischt. Die Trennung ist keine einfache rückläufige Vereinigung. Starke „Zugwirkung“ zwischen den sich trennenden Partnern besteht ohne Zweifel. Das „Ektoplasmarohr“ verengt sich unter Verdrängung des Entoplasma, bis

sich die ektoplasmatischen Alveolen berühren. Unter Ausziehen eines langen, weniger als  $1\mu$  dicken Plasmafadens, der schließlich zerreißt (und dabei im Zeitrafferlaufbild seine Elastizität zeigt), trennen sich die Partner. Der Zeitrafferfilm enthüllt die Dynamik dieses Vorganges.

6. Es kann auch eine Plasmogamie mit einem Tier stattfinden, das gerade eine Trennung durchführt.

7. Durch Anwendung des Zeitrafferfilms wurden interessante, funktionell noch nicht geklärte plasmatische Verbindungsstränge zwischen zwei *Actinosphaerien* entdeckt, vorläufig als „temporäre Plasmabrücken“ bezeichnet. Das Plasmamaterial zu diesen im Zeitrafferlaufbild sehr beweglichen Strängen stammt offenbar zum Teil von verflüssigten Axopodien der Berührungszone. Beide Partner weisen in der Brückenregion eine mehr oder weniger tiefe Eindellung des Ektoplasma auf. Es werden drei Verhaltenstypen unterschieden. Ob Kerne bei der temporären Brückenbildung „beteiligt“ sind, muß noch untersucht werden.

8. Aus dem bewegungsphysiologischen Verhalten der Axopodien bei der Annäherung zweier oder mehrerer *Actinosphaerien* kann mit ziemlich großer Sicherheit geschlossen werden, ob eine Plasmogamie zustande kommen wird oder nicht. Bei der Ausbildung „temporärer Plasmabrücken“ folgt auf die erste Annäherung meist wieder eine Abstandsvergrößerung, dann wieder eine Annäherung usw. in mehrfachem Wechsel. Die eigentliche „Brücke“ zeigt unter Zeitraffung ihr lebhaftes Bewegungsspiel bei relativ großem Abstand der „Partner“ ( $70-80\mu$ ).

9. Phobisches Verhalten ist gekennzeichnet durch „gesträubte“ Anordnung der wirr durcheinander stehenden Axopodien. Es kann zur Einschmelzung einiger Axopodien kommen. Zwei und mehrere *Actinosphaerien* können auch mit mehr oder weniger tangential gerichteten Axopodien aneinander vorbeistreichen, wobei einige Axopodien „florettklingenähnlich“ umgebogen werden.

10. Über die Ursachen der hier mit Hilfe des Mikrozeitrafferfilms festgestellten Verhaltensweisen („Stimmungen“) der *Actinosphaerien* kann noch nichts ausgesagt werden.

11. Zeitrafferaufnahmen von encystierten Tieren ergaben, daß der Cysteninhalte langsam zu rotieren vermag, ohne daß zunächst über das Zustandekommen dieser Bewegung (keine Bewegungsorganelle vorhanden!) Vermutungen geäußert werden können.

12. Der übliche „Individualbegriff“ ist bei Einzellern, die im Laufe ihres Lebenszyklus Totalverschmelzungen (Plasmogamien) aufweisen, nicht ohne starke Einschränkung anwendbar. Die Trennungen in neue „Pseudoeindividuen“ erschweren die Begriffsbestimmung „Individuum“ bei *Actinosphaerium*, desgleichen die Vielzahl der Kerne (polyenergide Zelle). Von keinem im Freien gefangenen Tier ist die Vorgeschichte bekannt! Hier kann nur die „Graphische Form- und Korre-

lationsanalyse“ (Kuhl) helfen. Dem subjektiven Beobachter liegen zunächst nur Phasen einer „Pseudoindividualität“ vor. Erst die (große Zeiträume umfassende) Zeitrafferfilm-Aufnahme kann den Ablauf dieser Phasen in gewissem Umfange aufklären.

# Literatur

- Brandt, K.: Über die Fortpflanzung von *Actinosphaerium eichhorni*. Sitzungsber. d. Ges. naturforsch. Freunde. Berlin 1877.
- Über die Axenfäden der *Heliozoen* und die Bewegungen von *Actinosphaerium*. Sitzungsber. d. Ges. naturforsch. Freunde. Berlin 1878.
- Doflein-Reichenow: Lehrbuch d. Protozoenkunde. 5. Aufl. 1929.
- Hartmann, M.: *Rhizopoden*. Hdwb. d. Naturwiss. 2. Aufl. VIII. 1933.
- Kölliker, A. von: Das Sonnentierchen, *Actinophrys sol.* Z. f. wiss. Zool. I, 1849.
- Kuhl, W.: (Wegen der Methode der graphischen Form- und Korrelationsanalyse.) Die Variabilität der abdominalen Körperanhänge von *Forficula auricularia* L. unter Berücksichtigung ihrer normalen und abnormen Entwicklung, nebst einem Anhang über die Geschlechtsbiologie. Z. f. Morph. u. Ökol. d. Tiere, Abt. A d. Z. f. wiss. Biologie 12, 1928.
- Kinematische Zellforschung. Biologia generalis 16, 1942.
- Vorweisung von zwei Mikrozeitrafferfilmen über *Actinosphaerium eichhorni* Ehrbg. Verhdl. d. deutschen Zoologen in Mainz. 1949.
- Die technischen Grundlagen der kinematischen Zellforschung. Vorschläge für eine exakte wissenschaftliche Mikrokinematographie. Springer-Verlag (Heidelberg) 1949.
- (Unter Mitarbeit von G. Kuhl.) Mikrodynamische Untersuchungen an der lebenden Zelle von *Actinosphaerium eichhorni* Ehrbg. unter Änderung des Zeitmomentes (Zeitrafferlaufbild- und Teilbildanalyse). Protoplasma XL, 1951.
- Nozawa, Kanefumi: On the voluminal relation between the ectoplasm and endoplasm in an Heliozoon, *Actinosphaerium eichhorni* (Ehrenberg). Cytologia (Tokyo) 9, 1938.
- Ecto-endoplasmic ratio as a physiological factor for the determination of the cell volume of *Actinosphaerium eichhorni* (Ehrenberg). Jap. J. of Zool. 9, 1940.
- Studies on the quantitative relation between the nuclei and the cytoplasm in *Actinosphaerium eichhorni*. Jap. J. of Zool. 9, 1940.
- Osogoe, Bunsuke: Eine experimentell erzeugte reversible Teilungsumkehr bei *Actinosphaerium eichhorni* Ehrbg. Protoplasma 36, 1941.
- Penard, E.: Études sur quelques *Heliozoaires* d'eau douce. Arch. de Biologie IX, 1889.
- Wetzel, A.: Über die Zucht von *Actinosphaerium*. Zool. Anz. 96, 1931.
- Wittmann, H.: Untersuchungen zur Dynamik einiger Lebensvorgänge von *Amoeba sphaeronucleolus* Greef bei natürlichem „Zeitmoment“ und unter Zeitraffung. I. Teil: Protoplasma XXXIX, 1950; II. Teil: Protoplasma XL, 1951.

# Resistenz pflanzlicher Plasmen gegen 2,4-D

Von

**Richard Biebl**

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien

(Eingelangt am 12. November 1952)

## Einleitung

Seit Kögl in der  $\beta$ -Indolyllessigsäure ( $C_{10}H_9O_2N$ ) einen synthetisch in beliebiger Menge herzustellenden Wuchsstoff entdeckt hat, war es möglich, die Wuchsstoffwirkungen in umfangreichen Versuchsreihen nicht nur im Laboratorium, sondern auch im Freiland zu prüfen. Seit dieser Zeit rissen die Bemühungen nicht ab, praktische Anwendungsmöglichkeiten und neue synthetische Wirkstoffe zu finden. Beide Bestrebungen brachten reichen Erfolg. Es sind gegenwärtig schon mehrere hundert Stoffe bekannt, deren Wirksamkeit in einer Förderung des Zellstreckungswachstums und einer Beeinflussung verschiedenster physiologischer Reaktionen bzw. einer Änderung oder Störung der das normale Pflanzenwachstum kennzeichnenden Korrelationen besteht.

In der ersten Phase der angewandten Wuchsstoffforschung standen die sichtbar positiven Wirkungen der Wuchsstoffe auf die Pflanze im Vordergrund. Als eine zusammenfassende Darstellung dieser Periode können „Die Wuchshormone in der gärtnerischen Praxis“ von Amlong und Naundorf (1938) gelten. Ihr praktisches Ergebnis sind Wuchsstoffpräparate, wie z. B. das „Belvitan“, die in verdünnten wässrigen Lösungen zum Einquellen von Samen, als Zusatz zu Nährlösungen oder als Spritzmittel zur Wachstumsförderung, zum Frühtreiben oder zur Erzeugung parthenokarper Früchte verwendet werden. Mit Lanolin verrieben haben sie als „Wuchsstoffpasten“ durch Förderung von Kallus- und Wurzelbildung bei der Stecklingsvermehrung große gärtnerische Bedeutung erlangt. Vor Überdosierungen wurde gewarnt, da solche zu Wachstumsstörungen, verstärktem Dickenwachstum, Bildung funktionsloser Adventivwurzeln, abnormen Zellteilungen, Zellvergrößerungen und Gewebewucherungen und bei ungleichmäßiger Einwirkung an verschiedenen Teilen von Stengeln oder Blattstielen zu mannigfachen Krümmungen und schließlich zum Tod der Pflanze führen.

Die zweite Phase der landwirtschaftlichen Wuchsstoffforschung griff, aus der Not eine Tugend machend, die schädigenden und pflanzenötenden

Wirkungen größerer Wuchsstoffmengen auf. 1942 wurde in den USA unter den synthetischen Wuchsstoffen die 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure ( $C_8H_6O_5Cl_2$ ) als besonders aktiver Zellstreckungsstoff erkannt (Zimmermann und Hitchcock 1942) und 1944 erstmalig als Unkrautgift gegen *Convolvulus arvensis* geprüft (Hamner und Tuckey 1944), „Der Erfolg der Besprühung mit 2,4-D-Präparaten ist an den Unkrautpflänzchen, welche getroffen wurden, bereits nach kurzer Zeit, wenigen Stunden bis Tagen, deutlich zu sehen. Vor allem Hederich und Ackersenf, Franzosenkraut u. dgl. verkrümmen sich sehr schnell, stellen ihr weiteres Wachstum ein und beginnen, zur richtigen Zeit getroffen, nach wenigen Tagen abzusterben. Ihre Gewebe beginnen zu autolysieren, bei manchen Pflanzen werden Stengel und Wurzeln schwarz und faulen, die Pflanzen fallen zusammen und verschwinden schließlich bis auf geringe Reste“ (Linser 1951).

Allgemeinstes Interesse fanden diese schädigenden Wirkungen aber, als man beobachtete, daß verschiedene Pflanzen nicht in gleichem Maße von ihnen betroffen werden. Bei Besprühung von Mischbeständen beobachtete man, daß die dikotylen Pflanzen wesentlich stärkere Schädigungen erfuhren als die dazwischen stehenden monokotylen Gräser. Dies bot die Möglichkeit einer erfolgreichen selektiven Bekämpfung der dikotylen Ackerunkräuter in Getreidefeldern mit verschiedensten 2,4-D-Präparaten und war Anlaß für eine weitere intensive Erforschung dieser Wuchsstoffwirkungen. Eine kaum mehr übersehbare Literatur widmet sich diesen Fragen (neuere Zusammenstellung z. B. bei Linser 1951). Stoffwechseluntersuchungen an 2,4-D-behandelten Pflanzen konnten eine außerordentliche Steigerung der Atmung und damit einen raschen Abbau der Kohlehydratreserven nachweisen (Frohberger 1951 u. a.).

Seit 1945 werden in den USA und in England von der Industrie in großem Maßstab Unkrautbekämpfungsmittel auf Wuchsstoffgrundlage entwickelt. In Deutschland folgte als geschätztes 2,4-D-Präparat das „U 46“ (Stummeyer 1950) und in Österreich wird von den Linzer Stickstoffwerken ein Präparat der 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure als „Dicopur“ (Linser 1951) in den Handel gebracht.

Nach Frohberger (1951) ist die schlechte Benetzbarkeit und Aufnahmefähigkeit der Gramineen-Blätter für 2,4-D-Lösungen, neben der geschützten Lage des Vegetationspunktes, primär die Ursache der selektiven Wuchsstoffwirkung. Die inneren Voraussetzungen, d. h. die Reaktion des Plasmas und die darauffolgenden schweren Störungen im physiologischen Geschehen seien hingegen bei Monokotylen und Dikotylen die gleichen. Im wesentlichen mag dies zutreffen, doch deuten andererseits die bei der Unkrautbekämpfung gemachten Erfahrungen, daß es auch unter den dikotylen Unkräutern solche mit leichter und solche mit schwerer Bekämpfbarkeit gibt, darauf hin, daß neben einer wohl auch hier vorliegenden verschiedenen Benetzbarkeit und Aufnahmefähigkeit doch auch noch Unterschiede in der Plasmaempfindlichkeit und damit in der Reaktionsfähigkeit der betreffenden Pflanzen bestehen.

Die Plasmaresistenz von Pflanzen verschiedenster systematischer Zugehörigkeit gegenüber 2,4-D in zellphysiologischen Versuchen vergleichend

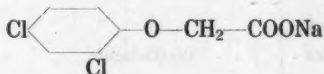
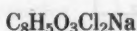


zu prüfen, ist jedoch bisher unterlassen worden. Im folgenden soll das Ergebnis solcher an zahlreichen mono- und dikotylen Pflanzen, an Moosen und einigen Farnen im Lauf einer Vegetationsperiode vorgenommener Resistenzuntersuchungen mitgeteilt werden.

### Methodik

Für die Methodik dieser Untersuchung lagen die Erfahrungen einer Anzahl vergleichender Studien über die Plasmaresistenz gegen verschiedene Spurenelemente vor (Biebl 1947 a, b, 1948, 1949, 1950 a, b). Epidermisschnitte von Stengeln, Blattstielen oder Blattflächen wurden in diesen Versuchen in Lösungsreihen von Borsäure, Zink-, Mangan- und Vanadylsulfat mit Konzentrationsstufen von 3, 1, 0,1, 0,01 und 0,001% gelegt und 48 Stunden später auf ihren Lebenszustand geprüft. Es ergaben sich für die einzelnen Pflanzenarten sehr charakteristische, für die einzelnen Stoffe oft recht verschieden große Unterschiede der Plasmaresistenz.

Die gleiche Methodik wurde in der vorliegenden Untersuchung zur Prüfung des Resistenzverhaltens der Plasmen von Pflanzen verschiedener systematischer Zugehörigkeit gegenüber einer konzentrationsabgestuften Lösungsreihe des Na-Salzes der 2,4-D-Dichlorphenoxyessigsäure (im folgenden kurz „2,4-D“ genannt) angewendet.



Natriumsalz der 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure.

Da sich die größten Unterschiede im Konzentrationsbereich zwischen 1 und 0,01% zeigten, wurden hier noch Konzentrationsstufen von 0,5 und 0,05% eingeschaltet. Eine weitere Vermehrung der Zwischenstufen würde vielleicht noch feinere Resistenzunterschiede aufdecken lassen, doch ist damit die Gefahr verbunden, daß dann auch schon individuelle Unterschiede zwischen Pflanzen einer Art aufgezeigt werden, die in großen, vergleichenden Versuchsreihen das Gesamtbild eher stören als fördern würden.

Die Lösungen wurden mit über Quarzglas bidestilliertem Wasser angesetzt. Die Kontrollen im destillierten Wasser waren nach Ablauf der Versuchszeit in allen Fällen frisch und lebend. Als Lebensreaktion wurde Plasmolyse in 0,8 GM  $\text{KNO}_3$  durchgeführt.

### Die Resistenzversuche

#### a) Vollentwickelte Pflanzen

Die in Tabelle 1 vergleichend zusammengestellten Werte der Plasmaresistenz gegen 2,4-D beziehen sich auf junge bis mittelalte, z. T. schon blühende Pflanzen. Jedem Wert liegen mehrere übereinstimmende Meßergebnisse zugrunde.

Tab. 1. 2,4-D-Resistenz verschiedener monokotyler und dikotyler Blütenpflanzen, Moose und Farne.

(1 = lebend, + = tot, ± = teilweise abgestorben, ? = nicht untersucht.)

Einwirkungsdauer der Lösungen 48 Stunden.

Versuchspflanze	Untersuchte Epidermis	% 2,4-D						
		2	1	0,5	0,1	0,05	0,01	0,001
Monokotyle								
Gramineae:								
<i>Triticum vulgare</i> . . . .	Blattscheide	+	+	+	1	1	1	1
<i>Hordeum distichum</i> . .	Blattscheide	+	+	+	1	1	1	1
<i>Avena sativa</i> . . . . .	Blattscheide	+	+	±	1	1	1	1
<i>Bromus sterilis</i> . . . .	Blattscheide	+	+	1	1	1	1	1
<i>Bromus tectorum</i> . . .	Blattscheide	+	+	+	1	1	1	1
<i>Bromus mollis</i> . . . .	Blattscheide	+	+	+	1	1	1	1
<i>Lolium perenne</i> . . . .	Blattscheide	+	+	1	1	1	1	1
<i>Poa annua</i> . . . . .	Blattscheide	+	±	1	1	1	1	1
<i>Hordeum murinum</i> . . .	Blattscheide	+	+	1	1	1	1	1
<i>Dactylis glomerata</i> . .	Blattscheide	+	+	1	1	1	1	1
<i>Cynodon dactylon</i> . . .	Blattscheide	+	+	+	1	1	1	1
Cyperaceae:								
<i>Carex silvatica</i> . . . .	Blattscheide	+	+	1	1	1	1	1
Liliaceae:								
<i>Allium cepa</i> . . . . .	Blattfläche	+	+	+	+	+	1	1
<i>Allium sativum</i> . . . .	Blattscheide	+	+	+	+	?	1	1
<i>Allium ursinum</i> . . . .	Blütenschaft	+	+	+	+	?	1	1
<i>Convallaria majalis</i> . .	Blattscheide	+	+	±	1	1	1	1
<i>Muscari racemosus</i> . . .	Blattstiel	+	+	+	1	1	1	1
<i>Veratrum album</i> . . . .	Stengel, Blatt- oberseite	+	+	+	+	1	1	1
Amarylidaceae:								
<i>Agapanthus umbellatus</i> .	Blattunterseite	+	1	1	1	1	1	1
Cannaceae:								
<i>Canna indica</i> . . . . .	Blattrippe	+	+	+	1	1	1	1
Commelinaceae:								
<i>Tradescantia viridis</i> . .	Stengel	+	+	+	1	1	1	1
<i>Tradescantia virginica</i> .	Stengel	+	+	1	1	1	1	1
<i>Tradescantia purpusi</i> . .	Stengel	+	+	+	1	1	1	1
<i>Rhoeo discolor</i> . . . . .	Blattunterseite	+	+	+	1	1	1	1
Iridaceae:								
<i>Iris spec.</i> . . . . .	Blattfläche	+	+	1	1	1	1	1

Versuchspflanze	Untersuchte Epidermis	% 2,4-D						
		2	1	0,5	0,1	0,05	0,01	0,001
Dikotyle								
Crucifereae:								
<i>Sinapis alba</i> . . . . .	Blattstiel	+	+	+	+	+	1	1
<i>Sinapis arvensis</i> . . . .	Stengel	+	+	+	+	+	1	1
<i>Raphanus raphanistrum</i>	Stengel	+	+	+	+	+	1	1
<i>Raphanus sativus</i> , Radies	Blattstiel	+	+	+	+	+	1	1
<i>Brassica oleracea</i> , Kohl .	Blattstiel	+	+	+	+	+	1	1
<i>Brassica oleracea</i> , Kohlrabi . . . . .	Blattstiel	+	+	+	+	+	1	1
<i>Brassica oleracea</i> , Blaukraut . . . . .	Blattstiel	+	+	+	+	+	1	1
<i>Cardamine pratensis</i> . .	Stengel	+	+	+	1	1	1	1
<i>Capsella bursa pastoris</i> .	Stengel	+	+	+	1	1	1	1
Solanaceae:								
<i>Datura Stramonium</i> . .	Blattstiel	+	+	+	+	+	1	1
<i>Solanum tuberosum</i> . .	Blattstiel	+	+	+	+	+	1	1
<i>Solanum dulcamara</i> . .	Stengel	+	+	+	+	?	1	1
<i>Solanum nigrum</i> . . . .	Stengel	+	+	+	+	1	1	1
Compositae:								
<i>Senecio vulgaris</i> . . . .	Stengel	+	+	+	1	1	1	1
<i>Erigeron canadense</i> . . .	Stengel	+	+	+	1	1	1	1
<i>Cirsium arvense</i> . . . .	Stengel, Blattrippe	+	+	+	±	1	1	1
<i>Achillea millefolium</i> . .	Stengel	+	+	+	±	1	1	1
<i>Matricaria inodora</i> . . .	Stengel	+	+	+	1	1	1	1
<i>Tussilago farfara</i> . . . .	Blattstiel	+	+	+	1	1	1	1
<i>Arctium Lappa</i> . . . .	Stengel, Blattstiel	+	+	+	+	1	1	1
<i>Galinsoga parviflora</i> . .	Stengel, Blattstiel	+	+	+	+	1	1	1
Labiatae:								
<i>Lamium purpureum</i> . .	Stengel	+	+	+	1	1	1	1
<i>Lamium maculatum</i> . .	Stengel	+	+	+	1	1	1	1
Rubiaceae:								
<i>Galium aparine</i> . . . .	Stengel	+	+	+	1	1	1	1
Plantaginaceae:								
<i>Plantago major</i> . . . .	Blattrippe	+	+	+	+	1	1	1
<i>Plantago lanceolata</i> . .	Blattrippe	+	+	+	+	1	1	1
Convolvulaceae:								
<i>Convolvulus arvensis</i> . .	Stengel	+	+	+	+	1	1	1

Versuchspflanze	Untersuchte Epidermis	% 2, 4-D						
		2	1	0,5	0,1	0,05	0,01	0,001
Chenopodiaceae:								
<i>Atriplex patulum</i> . . . .	Stengel	+	+	+	+	+	1	1
<i>Beta vulgaris</i> . . . . .	Blattstiel	+	+	+	+	?	1	1
Urticaceae:								
<i>Urtica dioica</i> . . . . .	Stengel	+	+	+	1	1	1	1
<i>Urtica urens</i> . . . . .	Stengel	+	+	+	1	1	1	1
Balsaminaceae:								
<i>Impatiens parviflora</i> . .	Stengel	+	+	+	+	1	1	1
Betulaceae:								
<i>Betula pendula</i> . . . .	Blattunterseite	+	+	+	1	1	1	1
Fagaceae:								
<i>Corylus avellana</i> . . . .	Blattunterseite	+	+	+	—1	1	1	1
Caryophyllaceae:								
<i>Stellaria media</i> . . . .	Stengel	+	+	1	1	1	1	1
Linaceae:								
<i>Linum austriacum</i> . . .	Stengel	+	+	±	1	1	1	1
Moose								
Laubmoose:								
<i>Hookeria lucens</i> . . . .	Blättchen	+	±	1	1	1	1	1
<i>Mnium rostratum</i> . . .	Blättchen	+	+	1	1	1	1	1
<i>Mnium undulatum</i> . . .	Blättchen	+	1	1	1	1	1	1
<i>Mnium stellare</i> . . . .	Blättchen	+	±	1	1	1	1	1
<i>Rhodobryum roseum</i> . .	Blättchen	+	1	1	1	1	1	1
Lebermoose:								
<i>Trichocolea tomentella</i> .	Sproß	+	+	1	1	1	1	1
<i>Bazzania trilobata</i> . . .	Blättchen	+	+	—1	1	1	1	1
<i>Metzgeria conjugata</i> . .	Sproß	+	+	1	1	1	1	1
<i>Plagiochila asplenioides</i> .	Blättchen	+	—1	1	1	1	1	1
Farne								
<i>Aspidium filix mas</i> . . .	Wedelstiel, Epid.	+	+	1	1	1	1	1
<i>Aspidium falcatum</i> . . .	Wedelstiel, Epid.	+	1	1	1	1	1	1
<i>Pteris cretica</i> . . . . .	Wedelstiel, Epid.	+	—1	1	1	1	1	1

Da es sich bei diesen Resistenzversuchen, mit Ausnahme der Moosblättchen, in allen Fällen um Epidermisschnitte handelte und eine Einwirkungszeit von 48 Stunden gewählt war, kann bei der Beurteilung der Ergebnisse von den Faktoren Benetzbarkeit und Eindringvermögen abgesehen werden. Die Resistenzunterschiede dürfen ausschließlich der verschiedenen Plasmaartung der verschiedenen Objekte zugeschrieben werden.

Ein Blick in die Tabelle zeigt, daß tatsächlich zwischen der Plasmaresistenz der Gramineen mit einer Lebensgrenze bei 0,1–0,5% 2,4-D und jener empfindlicher Dikotyledonen mit einer solchen bei 0,01–0,05% große konstitutionelle Unterschiede bestehen. Dehnt man den Vergleich jedoch auf alle dikotylen Pflanzen aus, so finden wir auch unter diesen sehr viele Arten, deren Zellen nach 48 Stunden auch in 0,1% 2,4-D noch leben. Wenn wir von dem Ausnahmefall der *Stellaria media*, die gelegentlich noch in 0,5% 2,4-D lebte, absehen, so dürfen wir immerhin verallgemeinern, daß die unter den Gramineen sehr häufige Lebensgrenze bei 0,5% 2,4-D von den dikotylen Pflanzen nicht erreicht wird.

Bei den Gräsern *Poa annua*, *Hordeum murinum* und *Dactylis glomerata* war die Resistenz der Epidermiszellen stets um eine Konzentrationsstufe höher als die der darunterliegenden Subepidermis.

Vergleichen wir weiter die Resistenz der Dikotyledonen mit jener monokotyl, nicht zu den Gramineen gehöriger Pflanzen, so sind die Unterschiede nicht so groß. So erreichen z. B. die *Allium*-Arten mit einer Lebensgrenze bei 0,01% 2,4-D die gleiche Empfindlichkeit wie die empfindlichsten Dikotylen. Der Durchschnitt der monokotylen Pflanzen scheint allerdings in ihrer Empfindlichkeit den resistentesten Dikotyledonen mit einer Lebensgrenze bei 0,1% zu entsprechen und einige, wie *Agapanthus umbellatus*, *Tradescantia virginica* oder *Iris*, vermögen sogar noch in 0,5% 2,4-D und darüber während einer Einwirkungszeit von 48 Stunden am Leben zu bleiben. Mit solchen Vertretern maximaler Resistenz übersteigen demnach außer den Gramineen auch noch einzelne andere monokotyle Pflanzen die 2,4-D-Resistenz der Dikotyledonen.

Durchwegs hoch liegt die Resistenzgrenze der Laub- und Lebermoose sowie auch der drei untersuchten Farne. Alle geprüften Moosblättchen und Farnepidermen lebten noch in 0,5% 2,4-D und einzelne besonders resistente Arten auch noch in 1%. In 2% 2,4-D waren hingegen alle abgestorben. Die große Resistenz der Moose stimmt gut überein mit ihrer plasmatischen Sonderstellung in Resistenzversuchen gegen Mangan- und Vanadylsulfat. Hier übertrafen sie in ihrer Resistenz jene der Blütenpflanzen sogar um ein Vielfaches (Biebl 1949, 1950).

Bemerkenswert ist weiter die ähnliche Resistenz nahe verwandter Formen. Die drei untersuchten *Allium*-Arten (Küchenzwiebel, Knoblauch und Bärenlauch) zeigen in gleicher Weise eine für Monokotyle auffallend hohe Empfindlichkeit. Unter den Dikotylen finden wir unter den Cruciferen, Solanaceen und Chenopodiaceen die empfindlichsten Formen. Von den Cruciferen sind die *Sinapis*-, *Raphanus*- und *Brassica*-Arten gleich hoch empfindlich, während *Cardamine pratensis* (Wiesenschaumkraut) und *Capsella bursa pastoris* (Hirtentäschelkraut) in der angewandten Konzen-



trationsreihe eine um zwei Stufen höhere Resistenz besitzen. Das ist um so bemerkenswerter, als die praktische Unkrautbekämpfung gleichfalls den Ackersenf und den Hederich als leichter bekämpfbar bezeichnet als das Hirtentäschelkraut (Linser 1951).

Auch die beiden Plantaginaceen *Plantago major* und *lanceolata*, die beiden Nesselarten *Urtica dioica* und *urens* und die Labiaten *Lamium purpureum* und *maculatum* zeigen, ihrer nahen Verwandtschaft entsprechend, jeweils untereinander gleiches Resistenzverhalten. Weniger einheitlich ist die Plasmaresistenz gegen 2,4-D unter den verschiedenen Compositen.

Tab. 2. Grad der Bekämpfbarkeit mit 2,4-D- und Plasmaresistenz.

Versuchspflanze	Zur Bekämpfung nötige Dicopurmenge	Im Plasmaresistenzversuch letale 2,4-D-Konzentration
<i>Sinapis arvensis</i> . . . . .	0,5–1,0 kg/ha	0,05%
<i>Raphanus raphanistrum</i> . .	0,5–1,0 kg/ha	0,05%
<i>Cirsium arvense</i> . . . . .	1,0 kg/ha	0,1% (bis 0,5%)
<i>Galinsoga parviflora</i> . . .	1,0 kg/ha	0,1% (bis 0,5%)
<i>Senecio vulgaris</i> . . . . .	1,0 kg/ha	0,5%
<i>Erigeron canadense</i> . . . .	1,0 kg/ha	0,1% (bis 0,5%)
<i>Achillea millefolium</i> . . . .	1,5 kg/ha	0,1% (bis 0,5%)
<i>Capsella bursa pastoris</i> . .	1,5 kg/ha	0,5%
<i>Urtica dioica</i> . . . . .	1,5 kg/ha	0,5%
<i>Urtica urens</i> . . . . .	1,5 kg/ha	0,5%
<i>Plantago media</i> . . . . .	1,5 kg/ha	0,1%
<i>Plantago lanceolata</i> . . . .	1,5 kg/ha	0,1%
<i>Lamium purpureum</i> . . . . .	1,5–2,0 kg/ha	0,5%
<i>Lamium maculatum</i> . . . . .	1,5–2,0 kg/ha	0,5%
<i>Matricaria inodora</i> . . . . .	1,5–2,0 kg/ha	0,5%
<i>Tussilago farfara</i> . . . . .	sehr schwer bekämpfbar	0,5%
<i>Convolvulus arvensis</i> . . .	sehr schwer bekämpfbar	0,1% (bis 0,5%)
<i>Galium aparine</i> . . . . .	sehr schwer bekämpfbar	0,5% (bis 1,0%)

Es ist interessant, die Ergebnisse unserer Resistenzversuche mit den Erfahrungen der Praxis über die Bekämpfbarkeit der einzelnen Unkrautarten zu vergleichen. Die hierfür vorliegenden Angaben (aus Linser und Primost 1950, Linser 1951) sind allerdings insofern nur als Richtwerte anzusehen, als zu beobachten ist, daß die Empfindlichkeit einer bestimmten Pflanze nicht in allen Entwicklungsstadien oder zu jeder Jahreszeit genau dieselbe ist. Einzeluntersuchungen über die Bekämpfbarkeit bestimmter Unkräuter in bestimmten Altersstufen oder zu bestimmten Jahreszeiten liegen aber noch nicht in hinreichender Zahl vor. Über Unterschiede der Plasmaresistenz in verschiedenen Entwicklungsstadien soll im nächsten Abschnitt die Rede sein.

Tabelle 2 stellt den Grad der Plasmaresistenz jenem der Bekämpfbarkeit mit 2,4-D-Präparaten (ausgedrückt durch die zur Bekämpfung nötigen Mengen) für jene Pflanzen gegenüber, für die bereits beide Angaben vorliegen.

Die Übereinstimmung der Werte ist, besonders wenn man die Möglichkeit von kleinen Unstimmigkeiten infolge Untersuchung nicht gleich empfindlicher Entwicklungsstadien oder infolge ungleichen Eindringens des Spritzmittels in die verschiedenen Pflanzen in Betracht zieht, auffallend gut. Die Plasmen der als leichtest bekämpfbar bezeichneten Cruciferen *Sinapis arvensis* und *Raphanus raphanistrum* sterben schon in 0,05% 2,4-D ab. Die leicht bekämpfbaren Unkräuter zeigen in den Lösungsreihen den Plasmatot durchschnittlich in 0,1 (bis 0,5)% 2,4-D, während Epidermisschnitte der schwer und schwerst bekämpfbaren fast durchwegs erst durch eine 0,5%ige Lösung getötet werden.

#### b) Plasmaresistenz und Entwicklungszustand der Pflanzen

Schon in der ersten Untersuchung über die Plasmaresistenz gegen Zink, Bor und Mangan (Biebl 1947 a) konnte an einigen Moosen gezeigt werden, daß die Resistenz bei manchen Moosen während des ganzen Jahres gleich bleibt, bei anderen hingegen wechselt. Es wurde im Hinblick auf die Resistenz gegen diese Stoffe zwischen „resistenzkonstanten“ und „resistenzveränderlichen“ Plasmasorten unterschieden. Die Berechtigung dieser Unterscheidung konnte von Rossi (1951) in einer Untersuchung über die Abhängigkeit der chemischen Resistenz pflanzlicher Plasmen von ihrem Entwicklungszustand bestätigt werden. Danach besitzen sogar fast alle Blütenpflanzen gegen die genannten Substanzen derartig „resistenzveränderliche“ Plasmen, wofür Alter des Gewebes und jahreszeitliche Einflüsse in wechselnd starkem Ausmaß verantwortlich zu sein scheinen. Besonders die Resistenz gegen Mangan- und Zinksulfat nahm mit dem Alter der Pflanzen bzw. gegen den Herbst hin stark zu. Die Solanaceen erwiesen sich hingegen als fast resistenzkonstant.

Dieser Veränderlichkeit der Resistenz gegen chemische Einwirkungen entsprechen auch andere alters- und jahreszeitlich bedingte Änderungen von Plasmaeigenschaften, wie der Permeabilität (Krassinsky 1929, Marklund 1936, Höfler 1937, Hofmeister 1938 u. a.), des osmotischen Wertes (Lidforss 1907, Ursprung und Blum 1916, Steiner 1939, Pisek 1950 u. a.), der Viskosität oder auch der Kälteresistenz (Weber und Hohenegger 1925, Kessler 1935, Kessler und Ruhland 1938 u. a.). Im besonderen sei auf die zusammenfassende Darstellung von Paech (1940) über die Änderungen der Plasmabeschaffenheit beim Altern von pflanzlichen Zellen hingewiesen.

Von einer Anzahl unserer Versuchspflanzen wurde die Resistenz gegen 2,4-D im Frühjahr (April/Mai) schon an wenige Tage alten, 2 bis 3 cm hohen Keimpflänzchen bestimmt, so daß diese verglichen werden konnte mit der Resistenz älterer und voll erwachsener, blühender und fruchtender Pflanzen (Mai/Oktober). Tabelle 3 gibt eine Zusammenstellung der Ergebnisse.

Tab. 3. 2,4-D-Resistenz und Entwicklungszustand der Pflanze:

Versuchspflanze	Entwicklungszustand und untersuchtes Gewebe (Epidermis)	Datum 1952	% 2,4-D				
			1	0,5	0,1	0,05	0,01
<i>Capsella bursa pastoris</i> .	Keimpflänzchen, Stengel	26. 4.	+	+	+	1	1
<i>Capsella bursa pastoris</i> .	Knospentadium, Stengel	26. 4.	+	+	1	1	1
<i>Capsella bursa pastoris</i> .	blühend, Stengel	19. 5.	+	+	1	1	1
<i>Capsella bursa pastoris</i> .	blühend, Stengel	27. 9.	+	+	1	1	1
<i>Cirsium arvense</i> . . . . .	Keimpflänzchen, Blattstiel	26. 4.	+	+	+	+	1
<i>Cirsium arvense</i> . . . . .	18 cm hoch, Blattrippe	23. 4.	+	+	+	1	1
<i>Cirsium arvense</i> . . . . .	junger Trieb aus altem Wurzelstock	8. 5.	+	+	+	1	1
<i>Cirsium arvense</i> . . . . .	ältere Pflanze, Blattrippe	27. 9.	+	+	+	1	1
<i>Galinsoga parviflora</i> . .	Keimpflänzchen, Stengel	19. 5.	+	+	+	+	1
<i>Galinsoga parviflora</i> . .	24 cm, blühend, Stengel	19. 5.	+	+	1	1	1
<i>Galinsoga parviflora</i> . .	45 cm, blühend, fruchtend, Stengel	22. 9.	+	+	1	1	1
<i>Galinsoga parviflora</i> . .	50 cm, blühend, fruchtend, Stengel	4. 10.	+	+	1	1	1
<i>Urtica urens</i> . . . . .	Keimpflänzchen, Stengel	19. 5.	+	+	+	1	1
<i>Urtica urens</i> . . . . .	25 cm, blühend, Stengel	19. 5.	+	+	1	1	1
<i>Matricaria inodora</i> . . .	2—2,5 cm, Blattstiel	26. 4.	+	+	1	1	1
<i>Matricaria inodora</i> . . .	12 cm, Knospen- stadium, Blattstiel	26. 4.	+	+	1	1	1
<i>Lamium purpureum</i> . .	Keimpflänzchen, Stengel	8. 5.	+	+	1	1	1
<i>Lamium purpureum</i> . .	19 cm, blühend, fruchtend, Stengel	8. 5.	+	+	1	1	1
<i>Lamium purpureum</i> . .	25 cm, blühend, fruchtend, Stengel	19. 5.	+	+	1	1	1
<i>Lamium purpureum</i> . .	28 cm, blühend, fruchtend, Stengel	27. 9.	+	+	1	1	1
<i>Senecio vulgaris</i> . . . .	Keimpflänzchen, Stengel	26. 4.	+	+	1	1	1
<i>Senecio vulgaris</i> . . . .	20 cm, blühend, Stengel	26. 4.	+	+	1	1	1
<i>Senecio vulgaris</i> . . . .	38 cm, blühend, Stengel	8. 5.	+	+	1	1	1
<i>Senecio vulgaris</i> . . . .	35 cm, blühend, Stengel	27. 9.	+	+	1	1	1

Tabelle 3 zeigt für die geprüften Objekte, daß bei ihnen die Plasmarisistenzänderungen mit dem Alter nicht sehr groß sind und daß die Resistenzzunahme von den Keimpflänzchen, die neben kaum entfalteten Laubblättchen noch kräftig grüne Keimblätter besitzen, zu den blühenden und fruchtenden Pflanzen im allgemeinen höchstens eine Konzentrationsstufe der Lösungsreihe beträgt. Bemerkenswert ist die vollkommen gleiche Plasmarisistenz ganz junger bis voll erwachsener Pflanzen von *Lamium purpureum* und *Senecio vulgaris* innerhalb einer Vegetationszeit von April bis Ende September. Ihr Plasma kann somit für diesen Zeitraum dem 2,4-D gegenüber als „resistenzkonstant“ bezeichnet werden.

Von den übrigen untersuchten Pflanzen zeigen *Tussilago farfara* und *Arctium lappa* etwa ab Anfang September eine Resistenzzunahme von 0,05 auf 0,1% 2,4-D. Auch *Solanum nigrum* hatte bei seiner letzten Untersuchung am 4. Oktober eine um eine Konzentrationsstufe höhere Lebensgrenze (0,1%) als zuvor und gleiches war auch bei Epidermisschnitten der Blattunterseite von *Canna indica* zu beobachten, deren Lebensgrenze im Juli bei 0,1, im Oktober jedoch bei 0,5% 2,4-D lag. Auch *Erigeron canadense* zeigt eine Andeutung von Resistenzsteigerung im September. Vom Spätherbst stehen entsprechende Versuche noch aus.

Verglichen mit dem Ausmaß der Resistenzänderung verschiedener Pflanzen gegen Borsäure, Zink- und Mangansulfat (Rossi 1951) ist die Änderung der Empfindlichkeit pflanzlicher Plasmen gegen 2,4-D, zumindest in der Beobachtungszeit von April bis Ende September, sehr gering. Wenn überhaupt, so erfolgt mit dem Alter bzw. mit fortschreitender Jahreszeit höchstens eine Resistenzzunahme um eine Konzentrationsstufe der in den Versuchen angewandten Lösungsreihe. Nur vier von sieben verschiedenen Keimpflänzchen zeigten eine etwas höhere Empfindlichkeit als die späteren Lebensstadien.

### Der Zellentod in 2,4-D

Das Studium der Absterbevorgänge und der Todesbilder nach Einwirkung verschiedenartiger Schädigungen, wie Hitze, Kälte, Trockenheit, Strahlungen oder chemischer Stoffe, hat der vergleichenden Protoplasmaforschung schon viele interessante Ergebnisse geliefert (vgl. Küster 1935, 1951, Lepeschkin 1937, Höfler 1938, Schindler 1938a, b u. v. a.). Die als Folge verschiedener Tötungsarten auftretenden Nekrosebilder sind für bestimmte Zellen oft sehr charakteristisch; für verschiedene Pflanzen können sie aber recht verschieden aussehen. Dies gilt besonders für Tötung durch chemische Stoffe und kann hier zum Teil wohl durch die verschiedenartigen Reaktionen der von Art zu Art verschiedenen Zellsaftstoffe mit den schädigenden Substanzen erklärt werden (Biebl 1950). Daneben kommt aber den Plasmen der verschiedenen Pflanzen selbst zweifellos auch ein verschiedenes Verhalten beim Zelltod zu.

So kann nach Einwirkung tödlicher 2,4-D-Konzentrationen als ein allgemeines Todesbild der Cruciferen (*Sinapis alba*, *S. arvensis*, *Raphanus raphanistrum*, Kohl, Kohlrabi, Rotkraut, Radieschen, *Capsella bursa pastoris*) und der Solanaceen (*Datura*, *stramonium*, *Solanum tuberosum* und

z. T. *Solanum nigrum*) eine starke Koagulation des absterbenden Plasmas und Abhebung des Protoplasten von den Zellwänden hervorgehoben werden. Auch bei *Atriplex*, den beiden untersuchten *Plantago*-Arten und bei *Urtica* tritt eine solche mehr oder weniger starke Abhebung des toten Protoplasten ein. In den übrigen Fällen, z. B. bei *Arctium lappa*, *Achillea*, *Galinsoga*, *Tradescantia*, *Matricaria*, *Corylus* oder *Iris* und auch bei allen Moosen, war nie oder kaum eine Abhebung des Plasmas in den toten Zellen zu beobachten. Die Zellinhalte waren hier wenig verändert und erschienen mehr oder minder gut „fixiert“. Die Plastiden waren häufig kaum aus ihrer natürlichen Lage verschoben. Gelegentlich konnte man bei diesen Objekten in letalen Grenzkonzentrationen wohl auch ein leichtes Abheben des koagulierenden Protoplasmas von der Zellwand sehen, in stärkeren Konzentrationen blieb es jedoch in der natürlichen Lage „fixiert“.

Neben diesen allgemeinen Zügen der 2,4-D-Nekrose unserer untersuchten Objekte wäre das verhältnismäßig gleichartige Verhalten anthokyangefärbter Zellsäfte zu erwähnen. Ihre Reaktionen mit dem einwirkenden Stoff sind nicht so mannigfaltig, wie dies z. B. nach Einwirkung von schädigenden Vanadylsulfat zu beobachten war (Biebl 1950), wo es bei den verschiedenen anthokyangefärbten Objekten zur Bildung von Entmischungskugeln, Tröpfchen-, Klümpchen- oder Krümelniederschlägen sowie Verfärbungen von tintenblau über grün bis hellgelb kommt. Entmischungserscheinungen oder Niederschläge waren nach 2,4-D-Einwirkung nie zu beobachten, doch erfuhren eine Reihe von roten oder blauvioletten Zellsäften in den absterbenden Zellen eine Verfärbung ins Bräunliche: So z. B. bei *Lamium purpureum*, *Arctium lappa*, *Cirsium arvense*, *Tussilago farfara*, *Tradescantia purpusi*, *Canna indica*, *Convolvulus arvensis* oder *Galinsoga parviflora*. Die Zellen der blauvioletten Epidermen von *Brassica oleracea* var. *capitata* (Rotkraut) oder var. *gongylodes* (Kohlrabi) waren demgegenüber im Tode entfärbt. Es ist hier allerdings möglich, daß der Zellsaft aus den absterbenden Zellen mit ihren koagulierenden, sich von den Membranen abhebenden Protoplasten vollständig ausgetreten ist.

Von den untersuchten Moosen zeigte das für zellphysiologische Untersuchungen vorzüglich geeignete, aus einer einzigen Zellschicht bestehende Blättchen des Laubmooses *Hookeria lucens* (Biebl 1940) interessante, regelmäßig wiederkehrende Nekrosen. In 0,5% 2,4-D sind alle Zellen lebend und in 0,8 GM  $\text{KNO}_3$  bikonvex, fast kugelig, plasmolysiert. In 1% 2,4-D finden sich in 0,8  $\text{KNO}_3$  neben lebenden, normal plasmolysierten Zellen schon größere Gruppen von Zellen, in denen das Plasma sich nicht mehr von den Zellwänden abhob, wobei die etwas verkleinerten Plastiden gleichmäßig über die ganze Zellfläche verteilt waren. Innerhalb dieses toten, aber nicht koagulierten, gut fixierten Plasmas waren im hypertonen Kaliumnitrat regelmäßig große, kreisrunde, wasserhelle Tonoplasten aufgetreten („Tonoplastenplasmolyse“). Die Vakuolenhülle hatte also ihre Semipermeabilität noch beibehalten. Anders in 2% 2,4-D. Hier war die Tötung vollständig. Der ganze Zellinhalt ist in seiner natürlichen Lage fixiert und auch die innere Plasmagrenzschicht zerstört.



Ein recht charakteristisches Todesbild zeigt *Mnium stellare*, das gegenüber den beiden anderen *Mnium*-Arten und den übrigen untersuchten Laubmoosen als einzige Form in den tödlich wirkenden 2,4-D-Konzentrationen eine grauschwarze Verfärbung der Membranen erfährt. Die toten Blättchen erscheinen schon makroskopisch ganz schwarz. Die toten Plastiden sind abgerundet, zusammengedrängt, aber nicht verklebt. Bei den übrigen Laubmoosen wie auch bei den Lebermoosen sind die durch 2,4-D getöteten Zellen mit ihren Chloroplasten meist recht gut fixiert. Bei den Lebermoosen sind in den letalen Grenzkonzentrationen die Ölkörper, jene gegen alle äußeren Einwirkungen empfindlichsten Inhaltskörper der Lebermooszellen, in Auflösung begriffen, während sie in stärkeren, absolut tödlichen Konzentrationen nach einer Einwirkungsdauer von 48 Stunden bereits vollkommen verschwunden sind.

### Besprechung der Versuche

Die vorliegende Untersuchung bestätigt die Brauchbarkeit der Methode, „nicht umweltbezogene konstitutionelle Resistenzen“ gegen bestimmte chemische Stoffe, die der Pflanze am natürlichen Standort nie in solcher Menge zur Verfügung stehen, daß es in Anpassung an sie zur Ausbildung von „ökologischen Resistenzen“ kommen könnte, zur Kennzeichnung verschiedener pflanzlicher Plasmasorten heranzuziehen (Biebl 1947, 1949). Gleichzeitig ist sie ein Beispiel ihrer praktischen Anwendbarkeit.

Die Plasmaresistenz gegen konzentrationsabgestufte Lösungen von 2,4-D ist bei verschiedenen Pflanzen verschieden groß und darf als Ausdruck einer verschiedenen Plasmaartung angesehen werden.

Der Grad der Plasmaresistenz, der (im allgemeinen an Epidermisschnitten) durch Feststellung der innerhalb 48 Stunden letal wirkenden 2,4-D-Konzentration bestimmt wurde, stimmt recht gut überein mit den von der Praxis gemachten Aussagen über die Bekämpfungsmöglichkeit der betreffenden Versuchspflanzen. Die schwer bekämpfbaren Unkräuter haben eine höhere Plasmaresistenz gegen 2,4-D als die leichtbekämpfbaren und vor allem die Gramineen eine höhere Resistenz als die meisten dikotylen Pflanzen.

Damit soll nicht gesagt sein, daß die bei der Unkrautbekämpfung angewandten 2,4-D-Konzentrationen an den betroffenen Pflanzen direkt als Plasmagift wirksam werden. Dagegen spricht einerseits, daß besprühte Pflanzen noch im Stadium weitgehender Verkrümmungen lebende Epidermen besitzen und andererseits, daß die in den Plasmaresistenzversuchen durch 48 Stunden einwirkenden Lösungen naturgemäß viel intensiver das Plasma angreifen als bei einmaliger Besprühung. Jedoch wird man aus dem Gleichlaufen der Plasmaresistenzen mit den in der Praxis festgestellten Graden der Bekämpfbarkeit schließen dürfen, daß die in unseren Reihenversuchen empfindlicheren Plasmen auch in ihren physiologischen Reaktionen gegenüber den bei der Unkrautbekämpfung aufgebrauchten Wuchsstoffmengen empfindlicher sind als die Pflanzen mit resistenteren Plasmen. Dies stimmt auch überein mit dem von Linser (1952) bei Anwendung der Pastenmethode (1938) beobachteten verschiedenen Verhalten monokotyler und dikotyler Pflanzen.

Bei der praktischen Unkrautbekämpfung wird aber beim Besprühen der intakten Pflanzen auch das Eindringevermögen des Wuchsstoffes und die Benetzbarkeit der Blätter eine wesentliche Rolle spielen. Darauf wird besonders in Fällen zu achten sein, in denen sich Unstimmigkeiten zwischen Plasmaresistenz und Bekämpfbarkeit ergeben. Für unsere Resistenzversuche sind diese Faktoren wohl ohne Bedeutung, denn sowohl die lange Einwirkungsdauer wie das Vorhandensein von Schnittflächen sichern ein leichtes Herankommen der Lösung an das Plasma. Das Molekularvolumen des 2,4-D-Natriumsalzes, dessen Molekulargewicht mit 243 zwischen dem des Rohrzuckers (342) und des Traubenzuckers (180) steht, ist nicht so groß, daß die physikalische Beschaffenheit der Zellwände dem Eindringen der Lösung in die Zelle auf die Dauer ein ernstes Hindernis bieten könnte. Die beobachteten Resistenzunterschiede dürfen daher sicher einer verschiedenen Empfindlichkeit der betreffenden Plasmen selbst zugeschrieben werden.

### Zusammenfassung

1. Es wurde an Epidermisschnitten einer großen Zahl mono- und dikotyler Pflanzen, einiger Farne und an Moosblättchen die Plasmaresistenz in konzentrationsabgestuften (0,001, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1 und 2%) Lösungen des Na-Salzes der 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure bestimmt.

2. Die Resistenzgrenzen, nach 48stündiger Einwirkung der Lösungen, liegen für verschiedene Pflanzen verschieden hoch.

3. Die größte Resistenz zeigen unter den Blütenpflanzen die Gramineen mit einer Lebensgrenze in 0,1 bis 0,5% 2,4-D, die kleinste vor allem Vertreter der Crucifereen und Solanaceen mit einer Lebensgrenze in 0,01 bis 0,05% 2,4-D.

4. Mit Vertretern maximaler Resistenz übersteigen außer den Gramineen auch noch einige andere monokotyle Pflanzen die 2,4-D-Resistenz der Dikotylen. Empfindliche Monokotyledonen, wie *Allium*-Arten, reichen aber in ihrer geringen Resistenz an die empfindlichsten dikotylen Pflanzen heran.

5. Nahe verwandte Arten zeigen zumeist gleiche Resistenz.

6. Plasmaresistenz und von der Praxis angegebene Grade der Bekämpfbarkeit stimmen im wesentlichen gut überein.

7. Die Plasmen ganz junger Keimpflänzchen zeigen häufig eine etwas größere Empfindlichkeit (*Capsella*, *Cirsium*, *Galinsoga*, *Urtica*), doch finden sich auch Beispiele für ein von den jüngsten Lebensstadien bis zu voll entwickelten, blühenden und fruchtenden Pflanzen gegen 2,4-D „resistenzkonstantes“ Plasma (*Matricaria*, *Lamium*, *Senecio*). In einigen Fällen ist gegen den Herbst zu eine Zunahme der Resistenz festzustellen.

8. Der Zelltod in 2,4-D zeigt bei den verschiedenen Pflanzen charakteristische Bilder. Groben Koagulationen und Plasmaabhebungen bei den einen stehen „Fixierungen“ des absterbenden Plasmas bei anderen gegenüber. Anthokyangefärbte Zellsäfte erfahren ziemlich einheitlich eine Verfärbung ins Bräunliche.

9. Als Ursache für das Gleichlaufen der Plasmaresistenz und den in der Praxis festgestellten Graden der Bekämpfbarkeit wird angenommen, daß

die in unseren Resistenzversuchen empfindlicheren Plasmen auch in ihren physiologischen Reaktionen gegenüber den bei der Unkrautbekämpfung aufgebrauchten Wuchsstoffmengen empfindlicher sind als die resistenten. Eine direkte Wirkung des 2,4-D als Plasmagift spielt wohl bei der Unkrautbekämpfung keine Rolle.

#### Literatur

- Amlong, H. U., und Naundorf, G., 1938: Die Wuchshormone in der gärtnerischen Praxis. Berlin.
- Biebl, R., 1940: Einige zellphysiologische Beobachtungen an *Hookeria lucens* (L.) Sm. Österr. Bot. Ztschr. 89, 300.
- 1947 a: Die Resistenz gegen Zink, Bor und Mangan als Mittel zur Kennzeichnung verschiedener pflanzlicher Plasmasorten. Akad. Wiss. Wien, Math.-nat. Kl., Abt. I, 175, 145.
- 1947 b: Über die gegensätzliche Wirkung der Spurenelemente Zink und Bor auf die Blattzellen von *Mnium rostratum*. Österr. Bot. Ztschr. 94, 61.
- 1949: Vergleichende chemische Resistenzstudien an pflanzlichen Plasmen. Protoplasma 39, 1.
- 1950 a: Über die Resistenz pflanzlicher Plasmen gegen Vanadium. Protoplasma 39, 251.
- 1950 b: Zellphysiologische Untersuchungen an Gemüsepflanzen. Biologia generalis 19, 236.
- Frohberger, E., 1951: Zur Wirkung der 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure auf Gewebe und Stoffwechsel der Pflanzen. Höfchen-Briefe, Veröff. d. „Bayer“-Pflanzenschutzabt. Leverkusen 4, 236.
- Hamner, Ch. L., and Tuckey, H. B., 1944: The herbicidal action of 2,4-Dichlorphenoxyacetic acid and 2,4,5-Trichlorphenoxyacetic acid on bindweed. Science 100, 154.
- Höfler, K., 1937: Spezifische Permeabilitätsreihen verschiedener Zellsorten derselben Pflanze. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 55 (133).
- 1938: Nekroseformen pflanzlicher Zellen. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 56, 451.
- Hofmeister, L., 1938: Verschiedene Permeabilitätsreihen bei einer und derselben Zellsorte von *Ranunculus repens*. Jahrb. wiss. Bot. 86, 401.
- Kessler, W., 1935: Über die inneren Ursachen der Kälteresistenz der Pflanze. Planta 24, 313.
- und Ruhland, W., 1938: Weitere Untersuchungen über die inneren Ursachen der Kälteresistenz. Planta 28, 159.
- Krassinsky, N., 1929: Über jahreszeitliche Veränderungen der Permeabilität des Protoplasmas. Protoplasma 9, 622.
- Küster, E., 1935: Die Pflanzenzelle. (2. Aufl. 1951.) Jena.
- Lepeschkin, W. W., 1937: Zellnekrobiose und Protoplasmatod. Protoplasma-Monogr. 12, Berlin.
- Lidforss, B., 1907: Die wintergrüne Flora. Eine biologische Untersuchung. Lunds Univ. Arsskr. N. F. 2, II, Nr. 13.
- Linser, H., 1938: Zur Methodik der Wuchsstoffbestimmung. Planta 28, 227.
- 1951: Unkrautbekämpfung auf hormonaler Basis. Die Bodenkultur 5, 191.
- 1952: Empfindlichkeitsunterschiede für Wuchsstoffe bei Koleoptilen und Primärblättern monokotyler sowie bei Epi- und Hypokotylen dikotyler Pflanzen. Planta 41, 25.

- Linser, H., und Primost, E., 1950: Erfahrungen mit Dicopur. Österr. Stickstoffwerke A. G., Biol. Labor., Nr. 6.
- Marklund, G., 1936: Vergleichende Permeabilitätsstudien an pflanzlichen Protoplasten. Acta bot. Fenn. 18, 1.
- Paech, K., 1940: Veränderungen des Plasmas während des Alterns pflanzlicher Zellen. Planta 31, 295.
- Pisek, A., 1950: Frosthärte und Zusammensetzung des Zellsaftes bei *Rhododendron ferrugineum*, *Pinus cembra* und *Picea excelsa*. Protoplasma 39, 129.
- Rossi, W., 1951: Über die chemische Resistenz pflanzlicher Plasmen und ihre Veränderung mit dem Entwicklungszustand (noch unveröff. Diss. Univ. Wien).
- Schindler, H., 1938 a: Tötungsart und Absterbebild. I. Der Alkalitod der Pflanzenzelle. Protoplasma 30, 186.
- 1938 b, II. Der Säuretod der Pflanzenzelle. Protoplasma 30, 547.
- Steiner, M., 1939: Die Zusammensetzung des Zellsaftes bei höheren Pflanzen in ihrer ökologischen Bedeutung. Ergebn. Biol. 17, 151.
- Ursprung, A., und Blum, B., 1911: 1. Verteilung des osmotischen Wertes in der Pflanze, 2. Einfluß der Außenbedingungen auf den osmotischen Wert, 3. Über die periodischen Schwankungen des osmotischen Wertes. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 34, 88.
- Weber, Fr., und Hohenegger, H., 1923: Reversible Viskositätserhöhung des Protoplasmas bei Kälte. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 41, 198.
- Zimmermann, P. W., und Hitchcock, A. E., 1942: Substituted phenoxy and benzoic acid growth substances and the relation of structure to physiological activity. Contrib. Boyce Thomps. Inst. 12, 321.

# Die Bedeutung der Pektin- und Zellulosekomponente für die Lage des Entladungspunktes pflanzlicher Zellwände\*)

Von

**Helmut Kinzel**

Aus dem pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien

(Eingelangt am 18. November 1952)

## Einleitung

Sehr viele der Substanzen, aus denen sich der pflanzliche wie der tierische Körper zusammensetzt, haben die Eigenschaften von makromolekularen Elektrolyten. Vor allem sind die Fälle häufig, in denen diese Stoffe Säure- oder Basennatur oder, im Falle der sogenannten Ampholyte, beide Eigenschaften kombiniert besitzen. Das heißt also, daß diese Stoffe fähig sind, H<sup>+</sup>-Ionen, OH<sup>-</sup>-Ionen oder beide abdissoziieren. Diese Dissoziation ist nun abhängig von dem Säuregrad des wässerigen Mediums, mit dem diese Stoffe imbibiert oder in dem sie gelöst sind. Saure Reaktion dieses wässerigen Mediums drängt die Dissoziation der sauren Gruppen zurück und begünstigt die der basischen Gruppen, im alkalischen Medium tritt der umgekehrte Effekt ein. In stark saurer Lösung liegt also eine solche basische oder ampholytische Substanz als positiv geladenes Kation vor, während eine saure Substanz dann nahezu undissoziiert und ungeladen ist. In alkalischer Lösung dagegen dissoziieren saure und ampholytische Substanzen unter Bildung von negativ geladenen Anionen, die basischen Substanzen dagegen dissoziieren nicht und bleiben ungeladen. Diese Veränderungen im elektrischen Zustand machen sich in charakteristischer Weise bemerkbar. Bei löslichen Stoffen kommt es zu Änderungen im elektro-phoretischen Verhalten, bei unlöslichen, in wässriger Phase gequollenen (also irgendwie gelartigen) Stoffen verändern sich die Adsorptionseigenschaften. Negativ geladene Gele adsorbieren kationenbildende Substanzen, also z. B. basische Farbstoffe, positiv geladene Gele adsorbieren anionenbildende Substanzen, also z. B. saure Farbstoffe. Überführt man nun ein ampholytisches Gel aus einer alkalischen Lösung über mehrere Zwischen-

<sup>1</sup> Der Österreichischen Akademie der Wissenschaften danke ich herzlich für die Gewährung einer Subvention aus den Mitteln der Zach-Stiftung.



stufen in eine saure, dann werden zuerst basische Farbstoffe adsorbiert, später jedoch, bevor die Anfärbung mit sauren Farbstoffen einsetzt, wird man zu einem Punkt in der  $p_H$ -Skala kommen, an dem weder basische noch saure Farbstoffe adsorbiert werden. Diesen Punkt nennt man den Isoelektrischen Punkt (IEP) der betreffenden Substanz. Hier halten sich die Säure- und Basendissoziation die Waage, der Stoff ist ungeladen und darum ungefärbt. Solche IEP-Bestimmungen mit Hilfe von Farbstoffpaaren sind an biologischen Objekten, im besonderen an Zellenbestandteilen, sehr oft durchgeführt worden (z. B. Robbins 1923, Pischinger 1926, Drawert 1937).

Die einfache, nicht „inkrustierte“ pflanzliche Zellwand zeigt nun deutlich saure Eigenschaften. Sie ist demnach in alkalischer und auch noch in schwach saurer Lösung negativ geladen und mit basischen Farbstoffen färbbar, in stark saurer Lösung meist ungeladen und weder mit sauren noch mit basischen Farbstoffen färbbar. Die Färbeschwelle liegt meist bei oder etwas unter  $p_H 5$  (Drawert 1937, 1938, Strugger 1940), bei *Elodea canadensis* tiefer (Drawert 1937, 1938), bei den Chitinmembranen von Pilzen höher (Höfler und Pecksieder 1947). Färbt man die Objekte mit dem Fluoreszenzfarbstoff Acridinorange, so tritt, wie das Strugger (1940) zuerst gesehen hat, diese Färbeschwelle durch auffällige Unterschiede der Fluoreszenzfarben hervor: Unterhalb von  $p_H 5$  leuchten die Membranen schwach grün, bei und oberhalb von  $p_H 5$  stark kupferrot.

Diese Färbeschwelle der Zellwand wurde nun wie die bei Ampholyten erhaltenen Schwellen als der Isoelektrische Punkt (IEP) der Membran bezeichnet. Höfler (1946) hat aber darauf aufmerksam gemacht, daß dieser Ausdruck bei der Zellwand mit ihrem zumeist rein sauren Charakter wohl nicht ganz am Platze ist. Drawert (1951) entgegnet, daß man in gewissen Fällen doch von einem IEP der Zellwand sprechen könne. Vor allem für die Zellwände meristematischer Gewebe ist ja anzunehmen, daß sie Eiweißstoffe enthalten und damit Ampholyteigenschaften besitzen. Auch für die Cuticula hat neuerdings Härtel (1952) eine Umladbarkeit wahrscheinlich gemacht. Das Gros der pflanzlichen Zellwände zeigt aber, wie auch Drawert (1951) bestätigt, in Farblösungsreihen mit fallendem  $p_H$  nur Entladung und keine Umladung. Unter diesen Umständen werden wohl die Ausdrücke „Isoelektrischer Punkt“ (IEP) und „Entladungspunkt“ (EP) der pflanzlichen Zellwand nebeneinander gebraucht werden dürfen und nur bei der Besprechung konkreter Einzelfälle ihre volle terminologische Bedeutung gewinnen. Ich selbst habe nur Entladungserscheinungen untersucht und daher den Ausdruck „Entladungspunkt“ verwendet.

Die vorliegende Arbeit ist der Frage nach der Ursache der Färbeschwelle um  $p_H 5$  gewidmet.

In der Vitalfärbungsliteratur wurde bereits da und dort darauf hingewiesen, daß die negative Ladung der Zellwand kaum auf die Zellulose allein zurückzuführen sein könne (vgl. z. B. Drawert 1951, S. 87). Vor allem aber auf Grund des biochemischen Schrifttums muß es hinlänglich bekannt sein, daß die pflanzliche Zellwand ein sehr komplexes Gebilde

ist und neben Zellulose und Hemizellulosen stets wechselnde Mengen von Pektin, dazu vielleicht fallweise geringe Mengen von Eiweiß enthält (vgl. Bonner 1936a u. b). Trotzdem bezeichnete man den  $p_H$ -Wert, an dem die oben erwähnte Färbeschwelle zu sehen ist, im allgemeinen ohne weiteres als den Entladungspunkt der Zellulosemembran. Daß dies wohl nicht zulässig ist, wird innerhalb der folgenden Ausführungen zu zeigen sein.

## 2. Versuch

Es erscheint zunächst notwendig, Untersuchungen über die Lage des Entladungspunktes reiner Zellulose wiederzugeben. Ich verwendete Wattefasern (Brunssche Verbandwatte der Heilmittelwerke Wien). Bei der Färbung dieser Fasern in den bekannten phosphatgepufferten Acridinorange-Lösungen fällt sofort auf, daß der bei den natürlichen Zellmembranen unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbare scharfe Farbumschlag Grün-Rot hier ausbleibt. Die Fasern fluoreszieren in saurer Lösung grell laubgrün, in neutraler Lösung sowie in reinem Wasser (A. O. 1 : 10 000) gelb. Dazwischen treten alle Übergangsfarben auf. Rote Farbtöne sind nur ganz selten an einzelnen Stellen von Präparaten, die in schwach saurer oder neutraler Lösung liegen, sichtbar. Auch in Acridinorangeflösungen (1 : 10 000), denen fallende  $CaCl_2$ -Konzentrationen zugesetzt wurden (solche Lösungen wirken hier ganz ähnlich wie die Pufferreihen, vgl. Kinzel 1953), kann man ähnliche Erscheinungen beobachten. In 0,18 Mol  $CaCl_2$  fluoresziert die Watte gelbgrün, in 0,003 goldgelb (dazwischen alle Übergänge). Um eine Imbibitionsfärbung im Sinne von Strugger (1940) sicher auszuschließen, brachte ich die Objekte meist in der Farblösung unter das Mikroskop. Die schwach grünliche Fluoreszenz der Farblösung ist neben dem grell gelbgrünen Leuchten der Zellulosefasern kaum bemerkbar. Auch die schwächer grünen Färbungen natürlicher Zellwände heben sich vom Farbton der verwendeten Lösungen stets deutlich ab.

Eine andere Reihe von Versuchen beschäftigte sich mit der Frage, wie sich natürliche Zellwände gegenüber Farbstoffen verhalten, wenn man sie auf chemischem Wege entweder von der Zellulose oder ihren Begleitstoffen befreit. Schon Anderson (1927) hat solche Versuche beschrieben. Er behandelte Stengelquerschnitte von *Solanum lycopersicum* zur Entfernung der Zellulose mit Kupferoxydammoniak und stellte an den Rückständen starke Färbbarkeit mit basischen Farbstoffen und Ausbleiben der Zellulosereaktionen fest. An Schnitten, die durch aufeinanderfolgende Behandlung mit Salzsäure und Ammoniak oder mit 3% Wasserstoffperoxyd von Pektinstoffen befreit worden waren, bemerkte er umgekehrt, daß sie sich nicht mehr mit basischen Farbstoffen, wohl aber mit Chlorzinkjod usw. anfärbten. Parallel dazu beobachtete er anatomische Veränderungen, die aber hier nicht zur Diskussion stehen.

Mich interessierte nun vor allem die Auswirkung solcher Behandlungsmethoden auf die Lage des Entladungspunktes. Ich untersuchte verschiedene pflanzliche Objekte in den bekannten Acridinorange-Phosphatpufferlösun-

gen. Die sauren Pufferreihen wurden in der üblichen Weise (vgl. Strüger 1938, 1949) hergestellt<sup>1</sup>.

Die Entfernung der Zellulose wurde stets durch längere (ein- bis viertägige) Behandlung der Schnitte mit frisch bereitetem Kupferoxydammoniak (Cuoxam) durchgeführt. Zum Herauslösen des Pektins werden in der Literatur verschiedene Verfahren angegeben. Das vielfach empfohlene mehrstündige Erhitzen der Objekte in 0,5% Ammonoxalatlösung hat sich in einem mit Sonnenblumenmark angestellten Versuche (Versuch 5) nicht ganz bewährt. Eine einigermaßen vollständige Entfernung des Pektins gelang aber z. B. durch Erhitzen mit kalt gesättigter (etwa 5%iger) Ammonoxalatlösung im Einschlußrohr auf ungefähr 150 Grad (Vers. 1, 3). Dabei leiden die Objekte begreiflicherweise sehr. Die besten Resultate erhielt ich mit der zugleich schonendsten Methode, dem Kisserschen Mazervationsverfahren (halbstündiges Erwärmen in 3–5%  $H_2O_2$  auf etwa 50 Grad).

#### Versuch 1:

*Impatiens Sultani*, junger Stamm, quer, 150  $\mu$  dick. Acridinorange 1:10 000, Phosphatpuffer m/150.

Eine Partie der Schnitte wurde unbehandelt gelassen, eine andere von Zellulose befreit (nicht ganz zweitägiger Aufenthalt in Cuoxam und gutes Auswaschen in sehr verdünnter Salzsäure und destilliertem Wasser), eine dritte von Pektin befreit (halbstündiges Erhitzen in kaltgesättigter Ammonoxalatlösung auf 155°). Je eine solche Partie von Schnitten wurde in einem getrennten Teilversuch bearbeitet.

Die im folgenden gebrauchten Ausdrücke „ohne Zellulose“ und „ohne Pektin“ bedeuten natürlich nur, daß die Hauptmenge dieser beiden Stoffe entfernt wurde.

#### Fluoreszenz der Kollenchym-Zellwände.

$p_H$	Normal Färbezeit 40 Minuten	Ohne Zellulose Färbezeit 35 Minuten	Ohne Pektin Färbezeit 65 Minuten
2,24	grün	rot	schwach bläulichgrün
2,38	schwach rot	rot	
2,56	rot	rot	
2,87	rot	rot	Übergänge
3,1	rot	rot	↓
3,46	rot	rot	bräunlichgrün

Der Xylem-Teil der Gefäßbündel leuchtete meist gelblichgrün, nur bei den von Pektin befreiten Schnitten in den schwächer sauren Farbbädern mehr gelb bis orangegeb.

<sup>1</sup> Die  $p_H$ -Werte wurden allerdings im vorliegenden Falle nicht mit dem Lautenschläger-Ionometer revidiert, da das Gerät des Institutes zeitweilig nicht zur Verfügung stand. Entsprechende Versuche in Lösungsreihen, die sich auf präzise Messungen stützen, bleiben daher nachzutragen. Dagegen sind die Versuche, die tabellarisch gegenübergestellt sind, untereinander streng vergleichbar, da sie mit identischen Lösungen durchgeführt wurden.

## Versuch 2:

*Petasites communis*, Blattstiel, quer, 150  $\mu$  dick. Acridinorange 1 : 10 000, Phosphatpuffer m/150.

Befreiung von Zellulose durch etwa 21stündigen Aufenthalt in Cuoxam und gutes Auswaschen in verdünnter Essigsäure und destilliertem Wasser.

Befreiung von Pektin durch halbstündiges Behandeln mit 5%  $H_2O_2$  bei 50°. Beim ersteren Verfahren bleiben größtenteils nur die Kollenchymringe übrig, das letztere führt zu weitgehender Mazeration des Gewebes sowie zum Auftreten eines körnigen Niederschlages in den Epidermiszellen, der bei allen  $p_H$ -Stufen braunrot fluoresziert.

## Fluoreszenz der Kollenchym-Zellwände.

$p_H$	Normal Färbezeit 55 Minuten	Ohne Zellulose Färbezeit 50 Minuten	Ohne Pektin Färbezeit 50 Minuten
2,04	grün	blass rot	grün
2,24	rötlich	rot	grün
2,56	rot	kräftig rot	grün
2,87	stark rot	kräftig rot	grün
3,1	grell rot	kräftig rot	grün
3,46	grell rot	kräftig rot	grün

Die Färbezeit wurde verhältnismäßig lang gewählt. Die Schnitte sind nämlich so substanzreich, daß eine Sättigung mit Farbstoff innerhalb der sonst in der Vitalfärbung üblichen Färbezeiten nicht möglich ist. Im übrigen ist der Ausdruck „Vitalfärbung“ in diesem Zusammenhange nicht mehr am Platze, da es sich ja doch zumeist um die Färbung von Zellwänden abgetöteter Gewebe handelt.

Von einiger Bedeutung für die behandelte Frage waren Beobachtungen an einem bereits makrochemisch untersuchten Objekt, nämlich an Orangenschalen. Ehrlich (1936, S. 1563) stellte fest, daß der innere, weiße Teil (das sogenannte Albedo) dieser Fruchtschalen bis zu 36% Pektin in der Trockensubstanz enthält. An Schnitten durch Orangenschalen läßt sich eine charakteristische Eigenfluoreszenz beobachten: Die Gefäße leuchten blau, die Epidermiszellwände weiß, die Öltropfen in den Sekretbehältern gelb.

## Versuch 3:

*Citrus Aurantium*, Fruchtschale, quer, 120–150  $\mu$  dick. Acridinorange 1 : 10 000, Phosphatpuffer m/150.

Befreiung von Zellulose durch 44stündigen Aufenthalt in Cuoxam und gutes Auswaschen in sehr verdünnter Salzsäure und destilliertem Wasser. Befreiung von Pektin durch halbstündiges Erhitzen mit kaltgesättigter Ammonoxalatlösung im Einschlußrohr auf etwa 160°.

## Fluoreszenz der Parenchym-Zellwände.

$p_H$	Normal Färbezeit 35 Minuten	Ohne Zellulose Färbezeit 35 Minuten	Ohne Pektin Färbezeit 30–35 Min.
2,24	grün	dunkel (ganz schwach Grünfluoreszenz)	grün
2,38	grün	dunkel	
2,56	grün mit gering. roter Sprenkelung	vereinzelte rote Töne	
2,87	Rotkomponente etwas stärker	zumeist rot	
3,1	rot-grün gesprenkelt	rot	grün
3,46	Rotkomp. überwiegt	rot	grün

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde hier und an anderen Stellen auf die Wiedergabe einer Anzahl von färberischen Details, die sich in den Protokollen finden, verzichtet. Der Ausdruck „gesprenkelt“ bezieht sich nicht auf einzelne Zellwände, sondern auf die ganze überblickte Schnittfläche.

Nachdem ich bereits, wie weiter oben beschrieben, eine gereinigte Zellulosefaser (Watte) untersucht hatte, wollte ich noch einige natürliche Fasern auf ihr färberisches Verhalten prüfen.

## Versuch 4:

Fasern von *Linum usitatissimum* (ungebleicht) in Acridinorange 1 : 10 000, Phosphatpuffer  $m/150$ , Färbezeit 20 Minuten.

$p_H$	Fluoreszenz
2,04	strahlend laubgrün bis gelblichgrün
2,24	wie oben
2,56	wie oben
2,87	Zunahme der gelben Farbtöne
3,1	An den Einzelfasern fluoresziert oft das Zentrum orange, die Außenpartien grün. Faserpakete meist noch grün bis gelbgrün.
3,46	Die meisten Fasern leuchten gelborange bis orange. Nur mehr wenige gelbe und grüne Töne.
A. O. 1 : 10 000 in dest. $H_2O$	Einzelfasern orange bis rotorange, Faserpakete in den zentralen Partien oft noch grün. Nach einer Stunde Färbezeit alles rotorange. Auch die Faserbündel haben sich jetzt zumeist durchgefärbt.

Fasern von *Boehmeria nivea* (Ramie), die nur orientierend untersucht wurden, zeigten ebenfalls um  $p_H$  2 grüne, um  $p_H$  3 gelbe und in destilliertem Wasser rote Fluoreszenz.

Es scheint so, als ob in den natürlichen Fasern noch verschiedene Begleitstoffe der Zellulose vorhanden wären, die bei der Reinigung — vor allem wohl im Bleichprozeß — entfernt werden. Lüdtko und Felser (1941) geben auch wirklich an, daß Flachs bedeutende Mengen von Pektin enthält.



Ein besonders dankbares Objekt, auf das mich Herr Prof. Höfler aufmerksam machte, ist Sonnenblumenmark. Das Gewebe ist hier sehr zart und weich, so daß es sich in natürlichem Zustande kaum schneiden läßt. Ich drückte jeweils ein Stückchen zwischen den Fingern so weit als möglich zusammen, klemmte es zwischen Holundermark und schnitt es in völlig trockenem Zustande mit trockenem Messer 90—120  $\mu$  dick. In Wasser gelegt, breiten sich die Schnitte tadellos aus.

Bei der Untersuchung der Schnitte mußte ich zu meinem Erstaunen feststellen, daß sie nach Acridinorange-Färbung in allen bisher verwendeten  $p_H$ -Stufen rot fluoreszieren. Auch in der sauersten Lösung (2,04) sowie in reiner  $n/100$  HCl ( $p_H$  2) erhält man noch einen ziegelroten Farbton. Erst in  $n/10$  HCl ( $p_H$  1) ist Grünfluoreszenz zu beobachten. (Im Gegensatz dazu zeigt Holundermark bei  $p_H$  3,46 grünlichgelbe bis gelbe, nur vereinzelt orange Fluoreszenz und in allen stärker sauren Stufen stete Verschiebung des Farbtones in Richtung Grün.) Ich mußte daher, um die genaue Lage des Entladungspunktes feststellen zu können, zu Pufferlösungen greifen, welche Messungen im  $p_H$ -Bereich zwischen 1 und 2 gestatten. Ich benützte Glykokoll-Salzsäure-Puffer nach Sörensen, hergestellt nach den Angaben von Kolthoff (1928, S. 1451).

#### Versuch 5:

*Helianthus annuus*, Stengelmark, 90  $\mu$  dick. Acridinorange 1 : 10 000, Glykokollpuffer  $n/10$ .

Befreiung von Zellulose durch 35stündige Einwirkung von Cuoxam, Versuch der Befreiung von Pektin durch 5½stündiges Erhitzen in 0,5% Ammonoxalat am siedenden Wasserbad.

#### Fluoreszenz der Zellwände.

$p_H$	Normal Färbezeit 55 Minuten	Ohne Zellulose Färbezeit 65 Minuten	„Ohne Pektin“ Färbezeit 60 Minuten
1,64	grün	grün	grün mit $\pm$ röt. Ton
1,93	vereinzelt rötlich	grün	grün mit $\pm$ röt. Ton
2,28	an den Ecken rötlich	grün	grün mit $\pm$ röt. Ton
2,61	rot	erste Anzeichen röt. Färbung	grün mit $\pm$ röt. Ton
2,92	grell rot	$\pm$ rötlich	rötlich
3,34	grell rot	rötlich — tief rot	schwach ziegelrot
3,68	grell rot	kräftig rot	ziegelrot

Aus diesem Ergebnis geht hervor, daß der Versuch, das Pektin mit 0,5% Ammonoxalat zu entfernen, mißlungen ist. Ferner zeigt sich beim Vergleich der in Versuch 5 geschilderten Erscheinungen mit den weiter oben gemachten Angaben für Phosphatpuffer, daß Farblösungen gleicher Wasserstoffionenkonzentration, aber verschiedener Art der Pufferung auch etwas verschiedene Wirkung haben. Dies wird verständlich, wenn man bedenkt, daß der verwendete Phosphatpuffer die Konzentration  $m/150$ , der Glykokollpuffer dagegen die Konzentration  $m/10$  hatte — und zwar war die

Stammlösung des letzteren  $m/10$  sowohl an Glykokoll als auch an Natriumchlorid, also eigentlich  $m/5$ . Daraus ergibt sich, daß im Glykokollpuffer außer den in erster Linie wirksamen  $H^+$ -Ionen noch eine — gegenüber dem Phosphatpuffer — bedeutend größere Menge anderer Kationen vorhanden sind, deren Wirkung die der  $H^+$ -Ionen verstärken. Versucht man den Glykokollpuffer auf das Zehnfache zu verdünnen, dann erhält man völlig andere Resultate. Scheinbar verändert das Verdünnen die  $c_H$  doch beträchtlich, was vor allem bei den stärkst sauren Lösungen, die fast nur mehr aus Salzsäure bestehen, begreiflich ist. (Ich konnte, wie schon oben gesagt, noch keine  $p_H$ -Werte messen.) Ähnliche Erscheinungen — wenn auch vielleicht etwas schwächer — zeigt ja übrigens auch der Phosphatpuffer, was ich schon früher (1953, S. 56) eingehender ausführte und innerhalb der vorliegenden Arbeit erneut bestätigen konnte.

Ich griff daher auf eine Methode zurück, deren ich mich innerhalb der eben zitierten Arbeit vielfach mit Erfolg bediente: Ich verwendete nun an Stelle von Farbpufferlösungen Farblösungen, die fallende Mengen von  $CaCl_2$  enthielten. In diesen zeigen sich Erscheinungen, die den in den Farbpufferlösungen beobachteten durchaus vergleichbar sind. Der Vorteil der Farbstoff- $CaCl_2$ -Lösungen besteht darin, daß die Adsorptionsverdrängung des Farbstoffes nicht — wie bei den Farbpufferlösungen — durch eine oft nicht ganz überblickbare Mehrheit von Kationen ( $H^+$  und Puffersalz-Ionen) bewirkt wird, sondern nur durch ein einziges Kation, das  $Ca^{++}$ -Ion<sup>2</sup>.

Die ersten Versuche mit solchen Lösungen brachten ein unerwartetes Ergebnis: Schnitte von Sonnenblumenmark zeigten nach Behandlung mit Acridinorange in hohen  $CaCl_2$ -Konzentrationen stets Rotfluoreszenz. Ich kam daher zunächst zu der Meinung, die adsorptionsverdrängende Kraft des  $Ca^{++}$ -Ions sei zu gering, um hier den Rot-Grün-Effekt auszulösen. Erst nach einigen Bemühungen konnte ich die etwas komplizierten Verhältnisse klären. Es kommt von einer bestimmten  $CaCl_2$ -Konzentration an (diese liegt für A. O. 1:10000 bei etwa 1 Mol) zu einer — in ihrem Wesen noch nicht geklärten — Veränderung des Farbstoffes. Die Lösungen fluoreszieren jetzt nicht mehr grün wie reine wässrige Acridinorangelösungen derselben Konzentration, sondern mehr gelb, etwa im Farbton von reinen wässrigen Acridinorangelösungen höherer Konzentration. (Vielleicht findet hier eine Dissoziationszurückdrängung des Farbsalzes statt.) In solchen Lösungen gefärbte Sonnenblumenmarkschnitte zeigten Rotfluoreszenz. Bei Verminderung der  $CaCl_2$ -Konzentration trat dann Grünfluoreszenz auf, bei weiterer Verminderung kam ich schließlich zur normalen Farbschwelle: Die Schnitte leuchteten wieder rot. Die erwähnte Veränderung des Farbstoffes in hohen

<sup>2</sup> Es braucht wohl nicht besonders hervorgehoben zu werden, daß ich bei der Empfehlung dieser Art von Lösungen ausschließlich die Untersuchung von Adsorptionsverdrängungserscheinungen im Auge habe, wie sie z. B. an der Zellwand zu beobachten sind. Für das Studium von Plasma- und Vakuolenfärbung sind natürlich gepufferte Farblösungen unentbehrlich, da ja die dafür erforderlichen Veränderungen im Dissoziationszustand des Farbstoffes nur durch entsprechende Variation der  $c_H$  hervorgebracht werden können.

$\text{CaCl}_2$ -Konzentrationen ist stark konzentrationsabhängig. Schon der Zusatz einer relativ geringen Wassermenge läßt die Fluoreszenz der Lösung von Gelb nach Grün umschlagen. Auch die Farbstoffkonzentration spielt eine Rolle. Die folgende Übersicht gibt die an Sonnenblumenmarksnitten gemachten Erfahrungen wieder.

Versuch 6:

*Helianthus annuus*, Stengelmark, 90  $\mu$  dick. Färbezeit rund 1 Stunde.

Ein Teil der Schnitte wurde nach eintägiger Färbezeit nochmals beobachtet, wobei sich keine wesentliche Veränderung der Färbung zeigte.

Fluoreszenz der Zellwände.

CaCl <sub>2</sub> -Konz. in Mol	Farbstoffkonzentration		
	1 : 10 000	1 : 50 000	1 : 100 000
2	rot	stumpf rot	grün
0,2	grün		
	stellenweise rötlich	grün	grün
0,02	stumpf rot	grün	grün
0,002	grell rot	kräftig rot	grün

Es wurden jeweils 9 cm<sup>3</sup>  $\text{CaCl}_2$ -Lösung der angegebenen Konzentration mit 1 cm<sup>3</sup> Farbstofflösung der zehnfachen angegebenen Konzentration gemischt. Die angegebenen  $\text{CaCl}_2$ -Konzentrationen sind daher, streng genommen, mit 0,9 zu multiplizieren.

Nachdem ich auf diese Weise die Lage des Entladungspunktes in  $\text{CaCl}_2$  für das genannte Objekt ungefähr bestimmt hatte, ging ich nun daran, diesen genauer festzulegen. Ich verwendete dazu eine logarithmische  $\text{CaCl}_2$ -Konzentrationsreihe, ähnlich der in meiner früheren Arbeit (1953, S. 57) angegebenen. Es wurden die Konzentrationen gewählt, deren Logarithmen 0,25—1, 0,00—1, 0,75—2, 0,5—2, 0,25—2 usw. betragen. Ich gebe im folgenden eine Tabelle über die Herstellung solcher Lösungen.

Tabelle 1.

Herstellung einer Lösungsreihe: Acridinorange 1 : 10 000 in  $\text{CaCl}_2$   
(logarithmische Konzentrationsstufen).

Konzentration in Mol		Volumen in cm <sup>3</sup>		
log. C	C/ $\text{CaCl}_2$	$\text{CaCl}_2$ 0,2 Mol	H <sub>2</sub> O	Acridinorange 1 : 1000
0,25—1	0,178	44,46	0,54	5
0,00—1	0,1	25,00	20,00	5
0,75—2	0,056	14,06	30,94	5
0,50—2	0,032	7,91	37,09	5
0,25—2	0,018	4,45	40,55	5
0,00—2	0,01	2,50	42,50	5
0,75—3	0,0056	1,41	43,59	5
0,50—3	0,0032	0,79	44,21	5

In diesen Lösungen wurden nun Schnitte von Sonnenblumenmark in normalem Zustande sowie nach Befreiung von Zellulose bzw. Pektin untersucht.

Versuch 7:

*Helianthus annuus*, Stengelmark, 90  $\mu$  dick. Acridinorange 1:10 000/ $\text{CaCl}_2$ . Färbezeit 1 Stunde.

Befreiung von Zellulose durch dreitägigen Aufenthalt in Cuoxam und gutes Auswaschen in sehr verdünnter Essigsäure und destilliertem Wasser. Befreiung von Pektin durch halbstündiges Erwärmen in 5%  $\text{H}_2\text{O}_2$  auf 60°. Nach letzterer Behandlung sind die Schnitte weitgehend mazeriert.

Mol $\text{CaCl}_2$	Normal	Ohne Zellulose	Ohne Pektin
0,178	grünlichweiß	grün	grünlichweiß
0,1	grünlichweiß	grün	grünlichweiß
0,056	grünlichweiß	grün	grünlichweiß
0,032	schwach rötlich	grün	grünlichweiß
0,018	rot	rötlich	grünlichweiß
0,01	grell rot	rot	grünlichweiß
0,0056	grell rot	kräftig rot	grünlichweiß
0,0032	grell rot	kräftig rot	schwach rötlich

Im Anschluß daran sei ein Versuch mit *Petasites communis* wiedergegeben, der das Verhalten der verschiedenen Gewebelemente zeigt. Die Schnitte waren einen Monat lang in 30%igem Alkohol aufbewahrt worden und kamen vor der Untersuchung für einige Zeit in destilliertes Wasser.

Versuch 8:

*Petasites communis*, Blattstiel, quer, 150  $\mu$  dick (aus 30%igem Alkohol). Acridinorange 1:10 000/ $\text{CaCl}_2$ . Färbezeit 1 Stunde.

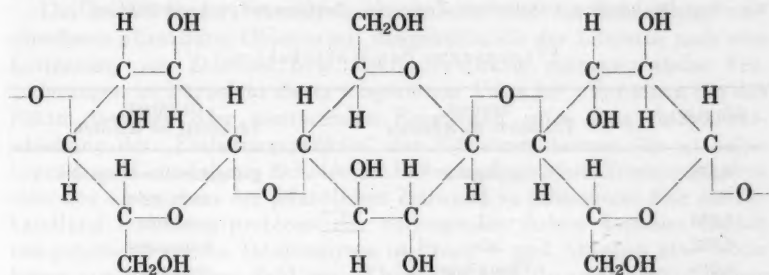
Fluoreszenz der Zellwände.

Mol $\text{CaCl}_2$	Kollenchym	Parenchym	Phloem	Xylem
0,178	grün	grün	grün	orangegelb
0,1	Stich ins bräunl.	grün	grün	orangegelb
0,056	Stich ins bräunl.	grün	grün	orangegelb
0,032	bräunlich	grün	grün	orangegelb
0,018	rot	rot	rot	orangegelb
0,01	rot	rot	rot	teilw. zitroneng.
0,0056	kräftig rot	kräftig rot	kräftig rot	meist zitroneng.
0,0032	grell rot	grell rot	grell rot	meist zitroneng.

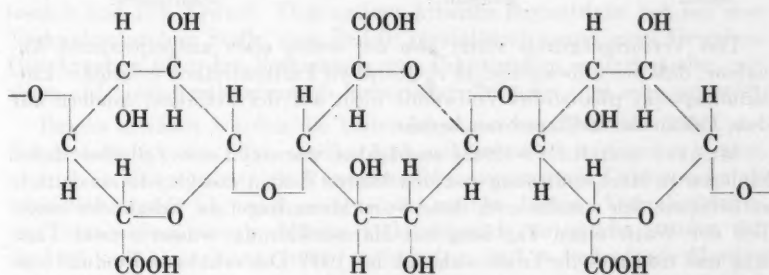
Die Untersuchung von Objekten, die von Zellulose bzw. von Pektin befreit worden waren, hatte es wahrscheinlich gemacht, daß die Färbe-

schwelle Grün-Rot irgendwie mit den in der Zellwand vorhandenen Pektinstoffen zusammenhängt. An pektinfreien Schnitten blieb die Rotfärbung aus oder sie trat erst bei bedeutend niedrigerer  $H^+$ - oder  $Ca^{++}$ -Konzentration ein. Ich nahm an, daß die in den Pektinstoffen vorhandenen  $COOH$ -Gruppen eine verstärkte Speicherung der Farbstoffionen bewirken, die schließlich zur Rotfluoreszenz führt. Um diese Annahme besser zu fundieren, versuchte ich, von ganz anderer Seite her Klarheit über den Färbemechanismus zu bekommen.

In neuerer Zeit wurden, besonders in Amerika, Verfahren entwickelt, die es möglich machen, Zellulose mit Hilfe von  $NO_2$  so zu oxydieren, daß die aus der Kette hervorragenden  $CH_2OH$ -Gruppen in  $COOH$ -Gruppen verwandelt werden.



Zellulose



Polyglucuronsäure

Wie aus den Formeln ersichtlich, entsteht dabei eine Polyglucuronsäure. Diese muß aber ganz ähnliche Eigenschaften besitzen wie die Pektinsäure (Polygalakturonsäure). Für die Speicherung basischer Farbstoffe wichtig sind ja vor allem die  $COOH$ -Gruppen, die hier wie dort vorhanden sind. Ich stellte nun folgende Überlegung an: Normale Wattfasern zeigen keinen ausgesprochenen Farbumschlag Grün-Rot. Wenn meine weiter oben ausgesprochene Annahme richtig ist, dann müßten auf die angegebene Weise oxydierte Wattfasern diesen Farbumschlag geben.



Die Oxydation wurde in Anlehnung an ein Verfahren durchgeführt, das bei Maurer und Reiff (1943, S. 32) angegeben ist. Etwa 5 g Watte wurden in einen großen, ca. 5 l fassenden Exsikkator gebracht. Dann wurde eine geringe Menge  $\text{NO}_2$  hinzugefügt, so daß das Gas im Exsikkator gelb gefärbt war. In dieser Atmosphäre wurde nun die Watte ungefähr 4 Wochen lang belassen, wobei von Zeit zu Zeit der Hahn geöffnet wurde, um Luft nachströmen zu lassen<sup>3</sup>. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde die Watte aus dem Exsikkator genommen und sehr gut gelüftet. Sie war zum Teil fast rein weiß, zum Teil etwas gelblich und löste sich in  $n/10$  NaOH langsam und unvollständig, in starker NaOH sofort.

#### Versuch 9:

Brunssche Verbandwatte (Heilmittelwerke Wien) in unvorbehandeltem und, wie oben beschrieben, oxydiertem Zustande. Acridinorange 1 : 10 000/ $\text{CaCl}_2$ .

#### Fluoreszenz der Watterfasern.

Mol $\text{CaCl}_2$	Normal Färbezeit 65 Minuten	Oxydiert Färbezeit 50 Minuten
0,178	gelbgrün	gelbgrün-zitronengelb
0,1	↓	rein gelb
0,056		orange
0,032	alle	rotorange
0,018	Übergänge	orangerot
0,01	zu	scharlachrot
0,0056	↓	scharlachrot
0,0032	goldgelb	scharlachrot

Das Versuchsergebnis stützt also die weiter oben ausgesprochene Annahme, daß der allbekannte, in  $c_H$ -gestuften Farbbadreihen erfaßbare Endladungspunkt pflanzlicher Zellwände nicht auf der Zellulose, sondern auf dem Pektin der Zellmembran beruht.

Maurer und Reiff (1943) empfehlen, die oxydierte Zellulose durch Einlegen in Harnstofflösung von den letzten Resten des Oxydationsmittels zu befreien. Ich wandte auch diese Vorsichtsmaßregel an, behandelte einen Teil der Watte einen Tag lang mit Harnstofflösung, wässerte zwei Tage lang und trocknete im Trockenschrank bei  $100^\circ$ . Das erhaltene Produkt war rein weiß und gab in einem orientierenden Versuch nach 110 Minuten langer Färbung in Acridinorange 1 : 10 000/ $\text{CaCl}_2$  0,01 Mol eine rotorange Fluoreszenz, während die Kontrolle (normale Watte) unter den gleichen Bedingungen einen grünlichgelben Farbton zeigte. Schließlich wurde noch ein Versuch angesetzt, der das Verhalten der oxydierten Watte in den üblichen Acridinorange-Phosphatpufferlösungen zeigen sollte. Diesmal betrug allerdings die Farbstoffkonzentration, im Gegensatz zu allen übrigen Versuchen, 1 : 5000.

<sup>3</sup> Das benötigte  $\text{NO}_2$  wurde durch Einwirkung von Salpetersäure auf Formaldehyd hergestellt (Vanino 1899).

## Versuch 10:

NO<sub>2</sub>-oxydierte und mit Harnstofflösung gereinigte Watte. Acridinorange  
1 : 5000, Phosphatpufferlösung m/150. Färbezeit 60 Minuten.

p <sub>H</sub>	Fluoreszenz der Fasern
2,04	orange
2,38	rotorange
2,87	rot
3,1	rot

## 3. Diskussion der Ergebnisse

Die beschriebenen Versuche haben gezeigt, daß die Behandlung verschiedener pflanzlicher Objekte mit Reagenzien, die der Literatur nach eine Entfernung von Zellulose bzw. Pektin bewirken, charakteristische Veränderungen im Färbbild dieser Objekte zur Folge hat. Vor allem die das Pektin lösenden oder zerstörenden Reagenzien rufen eine starke Verschiebung des „Entladungspunktes“ der Zellwände hervor. Es ist nahelegend, auf Grund dieser Befunde die bisher vorliegenden Literaturangaben über den Chemismus der pflanzlichen Zellwand zu betrachten. Für die Behandlung des Hauptproblems der vorliegenden Arbeit kommen freilich nur präzise chemische Totalanalysen in Frage — und Angaben über solche liegen erst in geringer Zahl vor. Thimann und Bonner (1933)<sup>4</sup> haben eine Totalanalyse der Zellwände von *Avena*-Koleoptilen versucht. Sie fanden 42% Zellulose, 8% Pektin, 28% Hemizellulosen a, 10% Hemizellulosen b und 12% Eiweiß. Viele andere Arbeiten beschäftigen sich mit dem Nachweis einzelner Stoffe, zum Teil in spezialisierten und toten Geweben. Die Angaben über das Vorkommen von Pektinstoffen in Zellwänden, vor allem auf Grund mikrochemisch-färberischer Befunde, sind sehr zahlreich.

Bereits erwähnt wurden die Untersuchungen von Ehrlich (1936), der Pektinstoffe in vielen Pflanzenteilen auch makrochemisch nachweisen konnte, so z. B. in den von mir als Versuchsobjekt verwendeten Orangenschalen. Schließlich fand ich, daß auch eines meiner besten Versuchsobjekte, das Sonnenblumenmark, bereits makrochemisch untersucht worden ist. Müller und Overbeck (1941) stellten fest, daß es bedeutende Mengen Pektin enthält. Sie konnten bis gegen 30% Uronsäuren, hauptsächlich Galakturonsäure, nachweisen.

Diese kleine Auswahl aus der vorliegenden Literatur läßt wohl bereits erkennen, daß die für die Zellwand wichtigen und charakteristischen Stoffe alle in der Gruppe der Kohlehydrate zu finden sind. Was das Vorkommen von Eiweiß betrifft, das nach Thimann und Bonner 12% der Zellwände der *Avena*-Koleoptilen ausmacht, so gibt Bonner (1936a) selbst zu, daß bei dem in der erstgenannten Untersuchung angewandten Verfahren unsicher bleibt, ob das Eiweiß nicht erst bei der Zubereitung der

<sup>4</sup> Zitiert und besprochen nach Bonner (1936a).

Präparate adsorbiert worden war. Bonner (1936a) zitiert eine Untersuchung von Wood (1926), der in Zellmembranen nie mehr als 0,001% Eiweiß finden konnte. Es bleibt nach diesen und anderen Befunden unsicher, ob in der Zellwand allgemein nennenswerte Mengen von Eiweiß vorkommen. An Kohlehydraten wurden vor allem nachgewiesen: Zellulose, die chemisch nicht eindeutig definierbare Gruppe der Hemizellulosen (vgl. Kinzel 1953, S. 68) und Pektinstoffe. Die Zellulose ist ein nahezu neutraler Stoff, von den Pektinstoffen (vgl. Kinzel 1952) ist bekannt, daß sie mehr oder weniger stark saure Eigenschaften besitzen.

Wenn nun der Zusammenhang mit den Färberscheinungen hergestellt werden soll, so ist zunächst darauf hinzuweisen, daß basische Farbstoffe wohl am ehesten von sauren Substraten unter Austauschadsorption oder Salzbindung gebunden werden dürften. Die Tatsache, daß die gespeicherten Farbstoffionen recht leicht gegen andere Kationen ausgetauscht werden können (Adsorptionsverdrängung, vgl. z. B. Höfler und Stiegler 1947), läßt darauf schließen, daß auch die Farbstoffspeicherung selbst, abgesehen von Spezialfällen (Brauner 1933), durch Austauschadsorption und nicht durch Salzbindung zustande kommt. Daß diese beiden Begriffe aber wohl nicht übergangslos nebeneinander stehen, habe ich schon früher (1953, S. 74) betont.

Bisher wurde angenommen, daß die auffällige Färbeschwelle, die die pflanzlichen Zellwände bei einer bestimmten  $c_H$  zeigen, dadurch hervorgerufen wird, daß bei dieser  $c_H$  der Entladungspunkt der Zellulose erreicht wird, unterhalb dessen sie keine größeren Farbstoffmengen mehr zu adsorbieren vermag. Wie steht es nun mit dem Farbstoffbindungsvermögen reiner Zellulose? Jeder, der schon einmal basische Farbstoffe mit Hilfe der Kapillaranalyse (vgl. Strugger 1949) untersucht hat, weiß, daß auch sehr reine Zellulose eine ausgeprägte Affinität zu basischen Farbstoffen besitzt. Auf welchen chemischen Eigenschaften der Zellulose beruht nun diese Affinität? Die „ideale“ Formel der Zellulose (vgl. S. 219) enthält ja keine im üblichen Sinne sauren Gruppen, und im älteren physikalisch-chemischen Schrifttum, in dem die Adsorptionerscheinungen oft als von der chemischen Natur des Adsorbens weitgehend unabhängig betrachtet wurden, empfand man diese Tatsache nicht als störend. In neuerer Zeit ist man jedoch immer mehr zu der Ansicht gekommen, daß zumindest die Austauschadsorption sehr eng mit den chemischen Eigenschaften des Adsorbens zusammenhängt. Parallel dazu stellte man fest, daß die Zusammensetzung realer Zellulosepräparate stets mehr oder weniger stark von der idealen Formel abweicht. Höfler (1946) diskutierte als erster auf botanischem Gebiet die von Meyer (1940) vertretene Ansicht, daß die Fixierung basischer Farbstoffe und andere anionische Eigenschaften der Zellulose auf deren Gehalt an Carboxylgruppen zurückzuführen seien. Diese Auffassung hat sich in der Chemie weitgehend gefestigt, in der Botanik ist sie zwar unwidersprochen geblieben, aber auch nicht weiter in Betracht gezogen worden.

Von chemischer Seite her wird heute der Sachverhalt folgendermaßen dargestellt (Meyer und Mark 1950): Normale Zellulose enthält stets eine

geringe Menge freier Carboxylgruppen. Ihre Zahl hat man da und dort zu bestimmen versucht. Es ist von einer COOH-Gruppe auf je 1000 bis 2000 Glucosereste die Rede, jedoch mit der ausdrücklichen Bemerkung, daß es sich dabei um keinen gesicherten Wert handle. Diese Carboxylgruppen scheinen nicht, wie man früher annahm, unregelmäßig über die Zelluloseketten verteilt zu sein, sondern als geschlossene Polyglucuronsäureketten vorzuliegen. Durch Umfällen aus Cuoxam läßt sich nämlich eine praktisch carboxylfreie Zellulose darstellen. Die Dissoziationskonstante der COOH-Gruppen soll in der Größenordnung von  $10^{-5}$ , diejenige der alkoholischen OH-Gruppen in der Größenordnung von  $10^{-14}$  liegen. Die Speicherung basischer Farbstoffe wird durch Austauschadsorption an den COOH-Gruppen erklärt. Doch soll auch die oben erwähnte carboxylfreie Zellulose geringe Mengen von Methylenblau festhalten.

Ich versuchte nun, eine ungefähre Vorstellung davon zu bekommen, wie stark eventuell die alkoholischen Hydroxyle am Zustandekommen einer Austauschadsorption beteiligt sein könnten. (Diese geht ja hier bekanntlich so vor sich, daß abdissoziierte, aber aus elektrostatischen Gründen in der Nähe der unbeweglichen Anionen festgehaltene H<sup>+</sup>-Ionen bis zu einem gewissen Grade gegen andere Kationen ausgetauscht werden.) Die oben angegebene Säuredissoziationskonstante für die alkoholischen Hydroxyle gilt für die Dissoziation von einer OH-Gruppe je Glucoserest. Zieht man nun in Betracht, daß eine COOH-Gruppe auf je 1000 Glucosereste vorkommen soll, dann ergibt sich, daß sich die dissoziierbaren OH-Gruppen zu den COOH-Gruppen wie 1000:1 verhalten. Setzt man die oben angegebenen Werte für die Dissoziationskonstanten in die bekannte, vereinfachte Gleichung  $a = \sqrt{\frac{K}{c}}$  ein, wobei die Konzentration der OH-Gruppen willkürlich als 1, diejenige der COOH-Gruppen dementsprechend als  $10^{-3}$  angenommen wird, dann ergibt sich der (relative) Dissoziationsgrad  $a$  der OH-Gruppen zu  $10^{-7}$ , derjenige der COOH-Gruppen zu  $10^{-1}$ . Das heißt, daß die Carboxylgruppen relativ  $10^6$ mal mehr H<sup>+</sup>-Ionen liefern als die alkoholischen Hydroxyle oder, wenn man das oben angegebene Konzentrationsverhältnis berücksichtigt, absolut immer noch tausendmal mehr. — Versucht man zu berechnen, unter welchen Bedingungen von den OH- und COOH-Gruppen eine (absolut) gleiche Menge von H<sup>+</sup>-Ionen geliefert wird, dann kommt man zu dem Ergebnis, daß dies erst dann der Fall sein würde, wenn eine COOH-Gruppe auf je  $10^9$  Glucosereste käme. Das bedeutet aber, daß man den Carboxylgehalt normaler Zellulose auf ein Milliontel des ursprünglichen Wertes herunterdrücken müßte, um den Einfluß der alkoholischen Hydroxyle auf deren negative Ladung merklich zu machen. Das dürfte aber mit den gebräuchlichen Reinigungsmethoden kaum zu erreichen sein. Auch die oben erwähnte praktisch carboxylfreie Zellulose wird wohl kaum einen derart niedrigen Carboxylgehalt gehabt haben, so daß die Angabe, daß diese Zellulose noch geringe Mengen von Methylenblau festhält, auf diese Weise vielleicht erklärlich wird.

So grob und ungenau diese Schätzungen auch sein mögen, so zeigen sie doch, daß die negative Ladung auch der normalen, „reinen“ Zellulose wohl

im wesentlichen durch die in ihr enthaltenen COOH-Gruppen hervorgerufen wird. Kanamaru (zitiert nach Meyer und Mark 1950, S. 397) hat gezeigt, daß sich durch Behandlung mit  $\text{AlCl}_3$  die Carboxylgruppen zu unlöslichen Komplexen verschließen lassen. Die erhaltene Zellulose ist dementsprechend ungeladen.

Es ist daher anzunehmen, daß diejenigen Färbungen der Zellulose mit basischen Farbstoffen, die rein elektroadsorptiver Natur sind, praktisch ausschließlich von deren Gehalt an Carboxylgruppen bestimmt wird<sup>5</sup>. Wo aber in einer pflanzlichen Zellwand außer der Zellulose noch Stoffe vorhanden sind, bei denen die sauren Gruppen einen wesentlichen Bestandteil des Moleküls ausmachen, wie dies z. B. bei den Pektinstoffen der Fall ist, dort wird natürlich die Farbstoffspeicherung zum überwiegenden Teile an diesen Stoffen stattfinden.

Als elektroadsorptive Färbungen sind dabei (für den Fall der Färbung saurer Kohlehydrate mit basischen Farbstoffen) diejenigen definiert, die mit steigendem Gehalt der Farblösung an adsorptionsverdrängend wirkenden Kationen ( $\text{H}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$  u. a.) an Stärke verlieren bzw. von einer bestimmten Grenze an ganz ausbleiben. Davon unterschieden sind z. B. die substantiven Färbungen, die ja durch einen Salzgehalt der Lösung oft in gegenteiligem Sinne beeinflusst werden (Schramek und Rümmler 1938). Davon unterschieden ist aber auch die grüne Fluoreszenzfärbung mit Acridinorange. Von ihr hat auch Härtel gezeigt, daß sie nicht, wie man zuerst annahm, eine Imbibitionsfärbung sein kann. Über ihre tatsächliche physikalisch-chemische Natur ist jedoch noch nichts Näheres bekannt.

Eine rein elektroadsorptive Färbung mit Acridinorange macht sich vor allem durch eine Rotfluoreszenz der Objekte bemerkbar. Bei natürlichen Zellwänden ist es meist so, daß in stark sauren und salzhaltigen Lösungen eine Grünfluoreszenz eintritt, die beim Heruntergehen in der Konzentrationsreihe über eine unbestimmte, bräunliche Zwischenfarbe ziemlich plötzlich einem roten Farbton Platz macht. Anders ist es jedoch bei allen Textilfasern, die ich untersucht habe. Hier zeigt sich ein breites Umschlagsintervall. Der Farbton geht von Grün über alle spektralen Zwischenstufen von Gelbgrün, Gelb und Orange allmählich in Rot über<sup>6</sup>. Bei reiner Zellulose (Wattefasern) kommt es gar nicht zu einer roten Fluoreszenzfarbe. Auch wenn man mit einer Acridinorangelösung in reinem Wasser färbt, fluoreszieren die Fasern nur gelb. Natürliche Textilfasern, die wohl noch Pektinstoffe enthalten, zeigen in dieser Lösung bereits Rot- oder Rotorange-Fluoreszenz. Die  $\text{NO}_2$ -oxydierte Watte, die ja sicherlich bedeutend mehr COOH-Gruppen enthält, fluoresziert bereits in einer Pufferlösung von  $p_{\text{H}}$  3 (bzw. in einer entsprechenden  $\text{CaCl}_2$ -Lösung) rot.

<sup>5</sup> In diesem Zusammenhang ist es vielleicht von Interesse, daß auch in der praktischen Zellulosechemie eine Methode ausgearbeitet worden ist, die es ermöglichen soll, durch kolorimetrische Messung von reversibel gebundenen Methylenblau den Carboxylgruppengehalt eines Zellulosepräparates zu bestimmen (Weber 1941).

<sup>6</sup> Ein ganz ähnliches Umschlagsintervall haben bereits Höfler u. Pecksieder (1947) an den Chitinmembranen von Pilzen beobachtet.



Wodurch diese auffällig verschiedene Art des Farbüberganges in der  $c_H$ -gestuften Farbbadreihe verursacht wird, läßt sich noch nicht voll übersehen. Als gesichertes Endergebnis darf aber wohl festgehalten werden, daß die Lage des Umschlagspunktes Grünfluoreszenz-Rotfluoreszenz (bei Ermittlung des EP der Membranen mittels Acridinorangefärbung) durch den Gehalt der betreffenden Zellwände an Carboxylgruppen bestimmt wird. Das heißt also im vorliegenden Falle praktisch, daß dieser EP durch den Gehalt der Membranen an Pektinstoffen festgelegt wird, die ja bei weitem die Hauptmenge der in den Zellmembranen vorkommenden COOH-Gruppen enthalten.

### Zusammenfassung

Der Entladungspunkt (EP, oft noch als IEP bezeichnet) wird mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops in den üblichen  $p_H$ -gestuften Acridinorange-reihen, außerdem aber in — stärker wirksamen — Farblösungsreihen mit steigendem  $\text{CaCl}_2$ -Zusatz bestimmt. In solchen Reihen zeigen pektinreiche Zellwände (z. B. Sonnenblumenmark) einen weiter im sauren Bereich bzw. bei höherem  $\text{CaCl}_2$ -Zusatz liegenden EP, während praktisch pektinfreie Substrate (z. B. Wattefasern aus reiner Zellulose) überhaupt keine deutliche Färbeschwelle zeigen.

Herauslösen der Zellulose aus Gewebeschnitten mit Cuoxam hat keinen nennenswerten Einfluß auf den EP, während Zerstörung des Pektins, z. B. mit  $\text{H}_2\text{O}_2$ , eine bedeutende Verschiebung des EP in Richtung des Neutralpunktes bewirkt.

Diese Versuchsergebnisse legen den Schluß nahe, daß die Ursache des elektroadsorptiven Bindungsvermögens der pflanzlichen Zellwand bei den vor allem im Pektin enthaltenen COOH-Gruppen zu suchen ist und daß die Lage des Entladungspunktes einer Zellwand vor allem vom Pektin-gehalt derselben bestimmt wird.

Es konnte auch in einem Modellversuch nachgewiesen werden, daß eine Vermehrung der in der Zellulose enthaltenen Carboxylgruppen durch  $\text{NO}_2$ -Oxydation eine Vergrößerung ihres Bindungsvermögens für basische Farbstoffe und eine Verschiebung des EP nach der sauren Seite hin zur Folge hat.

### Literatur

- Anderson, D. B., 1927: Über die Struktur der Kollenchymzellwand auf Grund mikrochemischer Untersuchungen. Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien, math.-nat. Kl., Abt. I, Bd. 136, S. 429.
- Bonner, J., 1936a: Zum Mechanismus der Zellstreckung auf Grund der Micellarlehre. Pringsh. Jahrb. wiss. Bot. 82, 377.
- 1936b: The chemistry and physiology of the pectins. Bot. Review 11, 475.
- Brauner, L., 1933: Zur Frage der postmortalen Farbstoffaufnahme von Pflanzenzellwänden. Flora 127, 190.
- Drawert, H., 1937: Das Verhalten der einzelnen Zellbestandteile fixierter pflanzlicher Gewebe gegen saure und basische Farbstoffe bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration. Flora 132, 91.
- 1938: Über die Aufnahme und Speicherung von Prune pure durch die pflanzliche Zelle. Planta 29, 179.

- Drawert, H., 1951: Beiträge zur Vitalfärbung pflanzlicher Zellen. *Protoplasma* 40, 85.
- Ehrlich, F., 1936: Pektin. In Abderhaldens Handb. d. biol. Arbeitsmeth., Abt. I, Teil 11, Heft 7.
- Härtel, O., 1951: Gerbstoffe als Ursache „voller“ Zellsäfte. *Protoplasma* 40, 338.
- 1952: Färbungsstudien an der pflanzlichen Kutikula. *Protoplasma* 41, 1.
- Höfler, K., 1946: Über den isoelektrischen Punkt natürlicher Zellulosemembranen und deren Färbbarkeit mit Fluorochromen. *Anzeiger d. Akad. Wiss. Wien, math.-nat. Kl.*, Jg. 1946, Nr. 7.
- u. E. Pecksieder, 1947: Fluoreszenzmikroskopische Beobachtungen an höheren Pilzen. *Österr. Bot. Ztschr.* 94, 99.
- u. A. Stiegler, 1947: Cresylechtviolett als Vitalfarbstoff. *Mikroskopie* 2, 250.
- Kinzel, H., 1952: Über Pektinstoffe. *Österr. Apothekerztg.* 6, 329.
- 1953: Untersuchungen über die Chemie und Physikochemie der Gallertbildungen von Süßwasseralgen. *Österr. Bot. Ztschr.* 100, 25.
- Kisser, J., 1926: Mazeration parenchymatischer Gewebe bei vollständiger Erhaltung des Zellinhaltes. *Planta* 2, 325.
- Kolthoff, J. M., 1928: Die Pufferlösungen bei der colorimetrischen Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration. *Abderhaldens Handb. d. biol. Arbeitsmeth.*, Abt. III, Teil A, Heft 7.
- Lüdtke, M., u. H. Felser, 1941: Zur Kenntnis der Pektinstoffe. *Liebigs Ann. d. Chem.* 549, 1.
- Maurer, K., u. G. Reiff, 1943: Die Oxydation der Zellulose mit Stickstoffdioxid. *Journ. macromol. Chem.*, 3. Reihe, Bd. 1, S. 27.
- Meyer, K. H., 1940: Die hochpolymeren Verbindungen. Leipzig.
- u. H. Mark, 1950: Makromolekulare Chemie. 2. Aufl. Leipzig.
- Müller, H. F., u. W. Overbeck, 1941: Zur Kenntnis der Einjahrespflanzen. *Ber. d. deutsch. Chem. Ges.* 75, 909.
- Pischinger, A., 1926: Die Lage des isoelektrischen Punktes histologischer Elemente als Ursache ihrer verschiedenen Färbbarkeit. *Zeitschr. f. Zellforschung u. mikroskop. Anatomie* 3, 169.
- Robbins, W. J., 1923: An isoelectric point for plant tissue and its significance. *Amer. J. Bot.* 10, 412.
- Schramek, W., u. H. Rümmler, 1938: Über die Substantivität einiger Benzidin-farbstoffe und benzidinähnlicher Farbstoffe. *Koll.-Beih.* 47, 133.
- Strugger, S., 1938: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Speicherung und Wanderung des Fluoreszeinkaliums in pflanzlichen Geweben. *Flora* 132, 253.
- 1940: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Aufnahme und Speicherung des Akridinorange durch lebende und tote Pflanzenzellen. *Jenaische Ztschr. f. Naturwiss.* 73, 97.
- 1949: Praktikum der Zell- und Gewebsphysiologie der Pflanze. 2. Aufl. Berlin-Göttingen-Heidelberg.
- Thimann, K. V., u. J. Bonner, 1935: The Mechanism of the Action of the Growth Substance of Plants. *Proc. Royal Soc., London, B.*, 113, 126.
- Vanino, L., 1899: Zur Darstellung von rauchender Salpetersäure. *Ber. d. deutsch. Chem. Ges.* 32, 1392.
- Weber, O. H., 1941: Eine neue Methode zur Bestimmung von Carboxylgruppen in Cellulose, Cellulosederivaten und anderen Produkten. *Journ. prakt. Chemie* 158, 33.
- Wood, F., 1926: Further Investigations of the Chemical Nature of the Cell Membrane. *Ann. Bot.* 40, 547.

## **Protistenstudien V**

### **Zur Struktur des Wimperapparates<sup>1</sup>**

(Zugleich ein Beitrag zur Präparation von Zellbestandteilen  
für elektronenmikroskopische Untersuchungen)

Von

**Karl-Ernst Wohlfarth-Bottermann und Gerhard Pfefferkorn**

Aus dem Zoologischen Institut und der Abteilung für Elektronenmikroskopie am  
Hygiene-Institut der Universität Münster i. W.

Mit 4 Textabbildungen

(Eingelangt am 8. Oktober 1952)

Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung von Zellbestandteilen ist eine Zerkleinerung der Zelle unerlässlich, um die Objekte wie Protoplasma, Kerne oder andere Zellorganelle in so dünner Schicht auszubreiten, daß sie für Elektronen bestimmter Geschwindigkeit annähernd durchstrahlbar werden. Dieser Eingriff in das Gefüge der lebenden Zelle, dem noch eine vollständige Eintrocknung des Präparates folgen muß, bringt häufig das Auftreten von Artefakten mit sich. Dies kann um so mehr befürchtet werden, als Strukturen des sublichtmikroskopischen Bereiches bisher nicht direkt sichtbar zu machen waren, so daß etwa auftretende Präparationsartefakte wegen Unkenntnis der normalen Struktur kaum festgestellt werden können. Eine Strukturänderung der lebenden Substanz ist zwar auch bei der Fixierung, beim Eintrocknen und schließlich bei der Untersuchung der Präparate (durch Wechselwirkung der Elektronen mit dem Objekt) zu erwarten. Eine Fixation mit chemischen Mitteln kann jedoch bei gewissen Objekten vermieden werden, und eine Eintrocknung läßt sich durch Anwendung indirekter Präparationsmethoden (z. B. gewisser Oberflächenabzugstechniken) umgehen; auch der Elektronenbeschuß kann sehr schonend vorgenommen werden, dagegen ist eine Zerkleinerung der Zelle unerlässlich. Dieser Eingriff wird heute in den meisten Fällen mit Hilfe von Spezialmikrotomen vorgenommen. Andere Zerkleinerungsmethoden wie Fragmentationen der Zelle

<sup>1</sup> Vorgetragen auf der Tagung der Dtsch. Zool. Ges. sowie auf der Tagung der Dtsch. Ges. für Elektronenmikr. im Juni 1952 in Freiburg i. Br. und Tübingen.

(z. B. durch Zerreiben) haben zwar den bedeutenden Vorteil, ohne die Einbettung der Objekte in Wachse (Bretschneider 1950 a) oder Polymerisationsmittel (Newman, Borysko und Swerdlow 1949) auszukommen, zeigen aber dafür die zu untersuchenden Strukturen nicht *in situ*. — Die vorliegende Arbeit wird unter anderem am Beispiel von Cilienfaserwurzeln, Basalkörpern und fibrillären Differenzierungen der Pellicula zeigen, daß bei einer Zerkleinerung der Zellen durch Dünnschnitten biologische Objekte stark deformiert werden. Aus einem Vergleich von Bildern, die einmal von Dünnschnitten gemacht wurden, zum anderen nach einfacher Fragmentierung (Zerplatzen der Zelle) gewonnen wurden, kann ersehen werden, daß die Dünnschnittmethode heute nur sehr bedingt Aussagen über sublichtmikroskopische Zellorganelle oder gar Protoplasmastrukturen zuläßt.

Pischinger hatte bereits 1950 auf Grund lichtmikroskopischer Erfahrungen und theoretischer Erwägungen ähnliche Bedenken geäußert, die jedoch leider kaum beachtet worden sind. An Hand der vorliegenden Befunde konnten seine Befürchtungen voll bestätigt werden.

### Technik

An elektronenmikroskopischen Befunden über die intracellulären Bestandteile des Wimperapparates liegen nach unserem Wissen nur die Untersuchungen von Bretschneider (1950 a und b) an verschiedenen Ciliaten sowie die Bilder von Sedar, Beams und Janney (1952) über das Flimmerepithel von Muscheln vor. Beide Arbeiten stützen sich auf Bilder, die aus Dünnschnitten erzielt wurden. Bretschneider untersuchte *Paramecium*, *Opalina* und *Isotricha* nach Fixation mit Flemming, Champy und Schaudinn bei Emissionsspannungen von 90 bis 110 kV und einer Schnittdicke von 0,3 bis 0,6  $\mu$ . — Sedar, Beams und Janney schnitten die Frontalregion der Kiemen von *Mya arenaria*. Als Fixationsmittel diente das Regaudsche Gemisch, Schnittdicke 0,2  $\mu$ . — In unseren Untersuchungen wurden Ciliaten der Gattung *Colpidium* nach Entnahme aus der Kultur einzeln durch Umsetzen mit Mikropipetten in destilliertem Wasser gewaschen und ohne Fixation auf einer Kollodiumfolie zur Eintrocknung gebracht. Die verschiedenen Organelle, wie Cilienfaserwurzeln, Basalkörper und die Pellicula, wurden also bei einem Zerplatzen der Zelle beim Eintrocknen freigelegt. Natürlich fiel nur ein geringer Bruchteil aller Präparate so günstig aus, daß Aufnahmen davon hergestellt werden konnten.

### Cilienfaserwurzeln

Zu dem im Tier- und Pflanzenreich weit verbreiteten Wimperapparat gehören sowohl in morphologischer als auch in funktioneller Hinsicht außer der eigentlichen Wimper oder Cilie auch die Cilienfaserwurzeln und die Basalkörper. Letztere sind auch unter der Bezeichnung Blepharoplasten oder Kinetosomen bekannt. Obgleich die Cilien Gegenstand einiger elektronenoptischer Untersuchungen gewesen sind (Ruska 1939; Jakus and Hall 1946; Krüger und Wohlfarth-Bottermann 1952; Wohlfarth-Bottermann 1952), so fehlen bisher überzeugende Abbildungen der sublichtmikroskopischen Struktur der Cilienfaserwurzeln. Der Grund hierfür liegt in der Tatsache, daß die frei aus

der Zelle herausragenden Cilien viel leichter und schonender präpariert werden können als die vom Ektoplasma ins Endoplasma hineinragenden Faserwurzeln. Eine genaue Kenntnis der Morphologie dieser Organelle erscheint um so wünschenswerter, als über die Funktion der Cilienfaserwurzeln bislang nur Vermutungen geäußert worden sind.

Wie bereits das Lichtmikroskop erkennen läßt, verlaufen die Cilienfaserwurzeln vom Basalkörper der Cilien in zentripetaler Richtung ins Innere der Zelle. Die Länge dieser sehr schmalen Organelle variiert in weiten Grenzen. Lange Cilienfaserwurzeln vereinigen sich oft als Wurzelkegel im Innern der Zelle. Von den lichtoptisch erkannten Eigenschaften ist die positiv einachsige Doppelbrechung (Schmidt 1937 a u. b) sowie ihre angeblich „varikös körnige“ Struktur zu nennen (nach Kolacev aus Klein 1932). Außer kontraktile, nervösen, nutritiven und stützenden Funktionen wurde durch von Gelei die Möglichkeit erwogen, daß diese Gebilde eine Verbindung des „intraplasmatischen Nervensystems zum subpelliculären Nervensystem“ darstellen könnten.

Die elektronenoptischen Ergebnisse Bretschneiders bezüglich der Cilienfaserwurzeln lassen sich wie folgt zusammenfassen: „Die Cilien-scheide setzt sich ohne Unterbrechung im Ektoplasma weiterhin als ein Zylinder fort, der aber keine Achsenfibrille besitzt, sondern mit Plasma angefüllt ist und identisch ist mit der sogenannten Cilienwurzel.“ Nach der Darstellung von Bretschneider, die durch ein Schema verdeutlicht wird, stellen die Cilienfaserwurzeln also mit Plasma gefüllte, in zentripetaler Richtung offene Röhren dar. Bretschneider zieht diesen Schluß aus Transversalschnittbildern, bei denen der Wimperapparat quer getroffen wurde. Die Abbildungen lassen jedoch leider keine Feinstrukturen erkennen.

Die Elektronenbilder von Sedar, Beams und Janney zeigen intracelluläre Fibrillen, die offenbar mit den Cilienfaserwurzeln identisch sind. Der Wimperapparat wurde hier längs getroffen. Die an den Basalkörpern entspringenden Fibrillen laufen in der Nähe des Kernes zusammen, der Durchmesser der Wimperwurzeln beträgt etwa 1000 Å.

Die von uns vorgenommene Präparation der Cilienfaserwurzeln ergab klarere Bilder, als sie die holländischen und amerikanischen Schnittuntersuchungen liefern konnten. Dies geht aus Abb. 1–3 deutlich hervor, wo die Cilienfaserwurzeln von *Colpidium* aus Präparaten dargestellt sind, die mit Platin-Rhodium schräg bedampft worden waren. Durch die Abbildungen 2 u. 3 wird deutlich, daß ein fibrillärer Aufbau vorliegt. Die sehr regelmäßige und deutliche Querstreifung zeigt eine Periode von etwa 540 Å<sup>2</sup>. Der Durchmesser der Cilienfasern nimmt in zentripetaler Richtung fortlaufend ab.

Nichts spricht für die Annahme von Bretschneider, daß die Cilienfaserwurzeln mit Protoplasma angefüllt seien.

<sup>2</sup> Eine ausführliche Zusammenstellung über Vorkommen und Bedeutung der sublichtmikroskopischen Perioden findet sich bei Zahn (1952) und Krüger, Wohlfarth-Bottermann und Pfefferkorn (1952).





Abb. 1. Elektronenoptisch 3000fach. Endvergrößerung 9000fach. Platin-Rhodium. 39 kV. Cilienfaserwurzeln und Basalkörper von *Colpidium*.

#### Basalkörper

Basale Verdickungen der Cilien oder Flagellen innerhalb der Zelle sind schon frühzeitig mit Hilfe des Lichtmikroskops entdeckt worden. Sie wur-



Abb. 2. E. O. 10 150fach. E. V. 25 000fach. Platin-Rhodium. 39 kV. Ausschnitt aus Abb. 1.

den Basalkörper, Blepharoplasten oder auch Kinetosomen genannt. Die Centriolen der Spermiumschwänze gleichen diesen Gebilden. Bei Metazoen treten die Basalkörper z. T. als Stäbchen oder Doppelkörner

in Erscheinung<sup>3</sup>. Wegen der Kleinheit dieser Organelle kann das Lichtmikroskop keine Aufschlüsse über ihre Struktur liefern. Über die Funktion des Basalkörpers sind daher ebenso wie über die Cilienfaserwurzel die allerverschiedensten Ansichten geäußert worden. Als wahrscheinlichste Annahmen wurden die einer reinen Verankerungsvorrichtung (Maier 1905; Pütter 1904) des Wimperapparates oder die eines kinetischen Zentrums der Cilien (Peter 1898) genannt. Nach der Henneguy-Lenhossekschen Theorie sind sämtliche Basalkörper Centriole bzw. Abkömmlinge derselben. In neuester Zeit haben besonders französische Autoren den Basalkörpern in weitgehendem Umfange morphogenetische Bedeutung beigemessen: Hiernach sollen sie teilungsfähige cytoplasmatische Einheiten darstellen, aus denen Cilien und Trichocysten hervorgehen. Eine Entstehung soll nur aus Basalkörpern, nie *de novo* möglich sein.

An elektronenmikroskopischen Aufnahmen liegen auch hier nur die von Bretschneider (1950b) und Sedar, Beams und Janney (1952) vor. Aber auch mit Hilfe des Elektronenmikroskops konnten noch keine Struktureinheiten festgestellt werden, die wohl auf Grund des höheren Auflösungsvermögens mit Recht erwartet werden durften.

Wie aus den morphologischen Untersuchungen von Sedar, Beams und Janney hervorgeht, stehen Cilie, Basalkörper und Cilienfaserwurzel in unmittelbarer Berührung miteinander und sind als Einheit aufzufassen.

Unsere Abbildungen 1—3 bestätigen diesen Befund, denn offenbar sind die an den oberen Enden der Cilienfaserwurzeln vorhandenen Verdickungen mit den Basalkörpern identisch. Abb. 2 u. 3 lassen erkennen, daß es sich bei den Basalkörpern um längliche Gebilde handelt, die offenbar Faserstruktur besitzen. Die Fibrillen der Cilien scheinen sich durch den Basalkörper direkt in die Fibrillen der Cilienfaserwurzeln fortzusetzen. Diese Tatsache steht im Einklang mit der Meinung von Klein (1952), daß aus den Basalkörpern die Cilienfasern hervorstüben. Offenbar haben sich im Falle der Abb. 2 u. 3 die Cilienfaserwurzeln von den Basalkörpern etwas abgelöst. Um den Basalkörper herumliegend erkennt man (besonders gut auf Abb. 3) einen Fibrillenring, der wahrscheinlich der Zirkularfibrille Kleins entspricht. Vom Basalkörper gehen mit großer Regelmäßigkeit ausfransende Fibrillenbündel aus, hier dürfte es sich um die von Gelei (1940) mit dem Basalkörper in Kontakt stehenden Längs- und Querneuronemen handeln. Da dieses „direkte Fibrillensystem“ bei der Präparation jedoch offenbar zerstört wurde, können keine Aussagen aus den noch sichtbaren Resten gemacht werden.

<sup>3</sup> In jüngster Zeit fanden Houwink und v. Iterson (1950) bei der Untersuchung autolyserter Bakterien, daß die Geißeln an „basalkörperähnlichen“ Gebilden von 100 m $\mu$  Durchmesser inserieren. Auch abgerissene Bakteriengeißeln zeigten am basalen Ende entsprechende Verdickungen. Inwieweit solche Strukturen morphologisch, genetisch und funktionell mit den Basalkörpern der Protisten und Metazoen zu vergleichen sind, ist noch völlig ungeklärt.

### Fibrilläre Differenzierungen der Pellicula

Fibrilläre Differenzierungen der Ciliaten-Pellicula sind aus lichtmikroskopischen Arbeiten bekannt. Vor allem sind hier die Befunde von von Gelei (1932, 1939, 1940) und Klein (1928, 1932, 1938, 1942) zu nennen, die das sogenannte „Silberliniensystem“ behandeln. Dieses liegt bei Ciliaten in oder unter der Pellicula und läßt sich indirekt durch Anlagerung von Silber mit Hilfe verschiedener Methoden sichtbar machen. Klein und von Gelei haben zwischen einem „direkten“ und einem „indirekten“ System unterschieden. Das direkte System soll die Cilien in Längsreihen untereinander verbinden, das indirekte System soll parallel dazu zwischen den einzelnen Cilienreihen verlaufen. Klein schreibt beiden Systemen eine erregungsleitende Funktion zu, von Gelei dagegen hält nur das direkte System für erregungsleitend und glaubt, daß das indirekte System eine statische Funktion erfülle. — Eine endgültige Entscheidung über die physiologische Leistung dieser Fibrillensysteme ist heute wohl noch nicht möglich. Es erscheint jedoch wahrscheinlich, daß das sogenannte „direkte“ System, das die Cilien in Längsreihen untereinander verbindet, erregungsleitende und koordinierende Funktion in bezug auf den Flimmerschlag besitzen kann.

Eine erste elektronenoptische Darstellung dieser Plasmadifferenzierungen wurde gleichfalls von Bretschneider und Sedar, Beams und Janney versucht. Bretschneider schließt aus seinen Aufnahmen, daß die Cilien bei *Paramecium* durch 65 m $\mu$  dicke Stränge verbunden seien, die er für identisch mit den Kleinschen Silberlinien hält. Die Bilder Bretschneiders lassen jedoch keine Entscheidung darüber zu, ob die von ihm dargestellten Silberlinien dem direkten oder dem indirekten System zuzuordnen sind.

Die Bilder der amerikanischen Autoren vom Kiemenepithel zeigen nur, daß die Basalkörper untereinander durch Stränge verbunden sind, irgendwelche neuen Struktureinheiten lassen sich an diesen Bildern ebenso wenig wie an denen von Bretschneider erkennen, so daß diese elektronenmikroskopischen Untersuchungen noch keinen Fortschritt gegenüber den lichtmikroskopischen Arbeiten erbringen konnten.

Abb. 4 zeigt die Pellicula von *Colpidium*, wie wir sie mit unserer einfachen Eintrocknungstechnik darstellen konnten. Man erkennt hier deutlich durchlaufende fibrilläre Differenzierungen. Diese vier Stränge dürften zum indirekten System gehören, dessen Fibrillenbündel zwischen den Cilienreihen verlaufen. Der fibrilläre Aufbau dieser Stränge geht aus Abb. 4 einwandfrei hervor. Die Fibrillenbündel des indirekten Systems verlaufen offenbar geradlinig ohne Verzweigungen und scheinen mit den Basalkörpern oder mit dem direkten System nicht in Verbindung zu stehen. Dies stimmt mit den lichtmikroskopischen Befunden von Klein (1939) überein, wonach *Colpidium* ein typisches Streifensystem besitzt. Wir können weiterhin aus Abb. 4 schließen, daß das hier dargestellte indirekte System sich in der Tat von dem direkten System durch seine räumliche Lage unterscheiden muß, da es sonst in Abb. 4 mit zur Darstellung gelangt sein müßte. Sonst wäre eine so saubere Trennung bei-



Abb. 3. E. O. 10 150fach. E. V. 38 000fach. Platin-Rhodium. 39 kV. Cilienfaserwurzel und Basalkörper von *Colpidium*.

der Systeme durch Auftrocknung allein kaum denkbar. Das direkte System, d. h. also die Verbindungen der Basalkörper untereinander, liegt offenbar tiefer als das indirekte System. Letzteres befindet sich nach Abb. 4 in oder aber direkt unterhalb der obersten Schicht der Pellicula. Für das Vor-



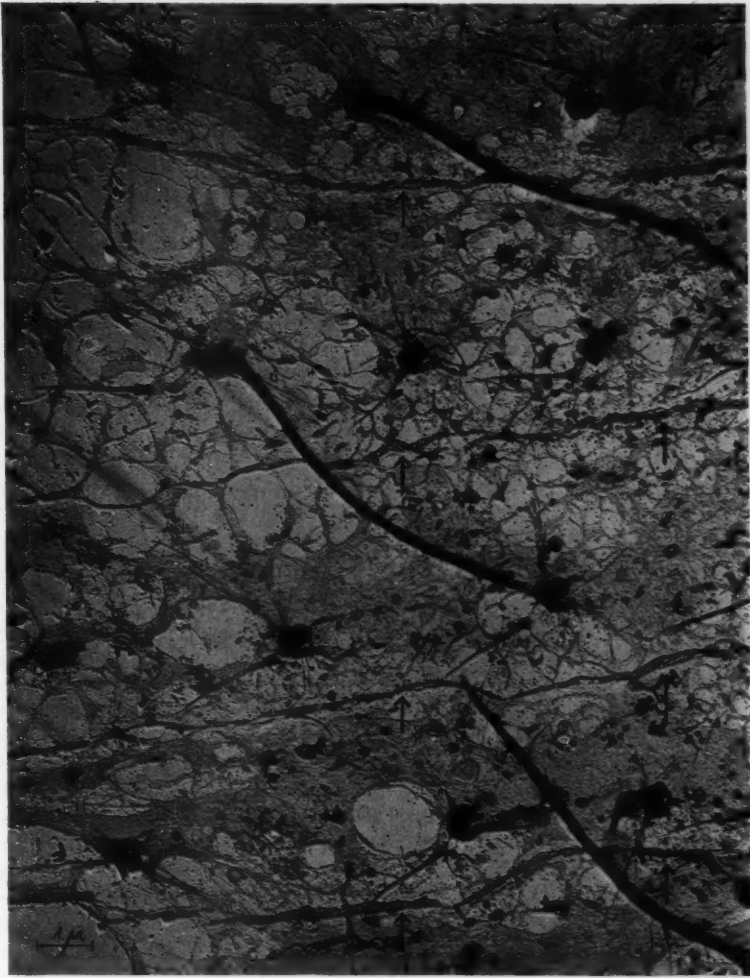


Abb. 4. E. O. 3000fach. E. V. 9000fach. Platin-Rhodium. 39 kV. Aufsicht auf die Pellicula von *Colpidium*. Fibrilläre Differenzierungen durch Pfeile markiert. Dazwischen Basalkörper, zum Teil mit Cilien. Cilienfaserwurzeln neben den Basalkörpern liegend.

handensein einer „plasmatischen Komponente“ dieser Fibrillenbündel ergibt sich aus Abb. 4 kein Hinweis. Klein (1932) berichtete, daß diese plasmatische Komponente der Silberlinien leicht zerfallen könne. — Die Festigkeit dieser Fibrillenstränge scheint gegenüber der eigentlichen Pellicula

nicht wesentlich erhöht zu sein. Ob diese sehr zarten Stränge eine mechanische Funktion innerhalb der Zelle erfüllen können, wie dies von Gelei glaubte, erscheint nicht ohne weiteres einleuchtend. Zur Entscheidung solcher Fragen bedarf es weiterer Untersuchungen. — Abb. 4 zeigt weiterhin, daß die Pellicula selbst eine feinfibrilläre Struktur besitzt. — Bretschneider beschreibt in seinem Schema der Cilieninsertion eine besondere Pellicularöffnung, durch die die Cilie die Pellicula durchstoßen soll. Außerdem sollen zwischen diesem „Pellicularring“ und der Cilienbasis 8–10 Fibrillen verlaufen, die radiär angeordnet die Cilie fixieren sollen. Wir konnten in unseren Bildern weder für eine gesondert ausgeprägte Pellicularöffnung oder einen Pellicularring noch für das Vorhandensein von 8 bis 10 Stützfibrillen irgendwelche Hinweise finden. Das von Bretschneider ausgearbeitete Schema über die Struktur und die Insertion des Wimperapparates, das bereits von Krüger und Wohlfarth-Bottermann (1952) als unrichtig in bezug auf die Feinstruktur der Cilie bezeichnet wurde, muß nun auch in bezug auf die intracellulären Bestandteile des Wimperapparates als falsch bezeichnet werden. Es erscheint uns jedoch auch heute noch verfrüht, die gefundenen Strukturen in einem Schema darzulegen.

### Allgemeine Bedeutung der Ergebnisse

Ein Vergleich von Abbildungen gleicher Zellorganelle, die einmal mit Hilfe der gebräuchlichen Dünnschnittmethode, zum anderen nach einfacher Fragmentation der Zelle ohne Fixierung untersucht wurden, läßt erkennen, wie weit die heutige Dünnschnitttechnik davon entfernt ist, aus dem sublichtmikroskopischen Größenordnungsbereich zuverlässige Bilder zu liefern. Damit soll nicht gesagt sein, daß die Dünnschnittmethode bei zweckmäßiger Abänderung der Technik nicht die Methode der Zukunft sein kann. Es ist nur dringend erforderlich, ihre heutigen Grenzen und Gefahren zu erkennen. Diese liegen offenbar in der Fixierungstechnik sowie in den zahlreichen rigorosen Eingriffen begründet, die die Einbettungstechnik für Wachse und Polymerisationsmittel mit sich bringen muß. Bei Kenntnis dieser Gefahren, die wir an den hier gezeigten bzw. zitierten Bildern demonstriert haben, erscheint eine zurückhaltendere Bewertung der zahlreichen Dünnschnittarbeiten, die heute Aussagen über sublichtmikroskopische Zellstrukturen machen wollen, dringend erforderlich.

Die hier beschriebenen intracellulären Teile des Wimperapparates sind Organelle, deren Festigkeit (Faserstruktur!) genügend groß ist, um auf eine Fixation bei der Präparation verzichten zu können. Erst wenn solche Organelle, die als Modelle für diese Untersuchungen sehr geeignet wären, sich nach der Präparation mit Hilfe der Dünnschnittmethode annähernd so gut darstellen lassen, d. h. also die gleichen Feinstrukturen zeigen wie nach einer Präparation mit Hilfe der schonenderen Fragmentationsmethode, dürfen wir Dünnschnittbildern mehr Vertrauen schenken. Wir haben somit gewissermaßen „Teststrukturen“, um die erforderlichen Verbesserungen

der Präparationsmethoden zu kontrollieren. Vor allem müßte wohl ein Durchgang von wasserunlöslichen Polymerisationsmitteln und Wachsen sowie deren Lösungsmitteln vermieden werden.

Vorliegende Arbeit wurde von dem einen von uns (Wohlfarth-Bottermann) im Rahmen eines Forschungsstipendiums der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen erzielten wir mit einem AEG-Zeiß-Gerät in der Abteilung für Elektronenmikroskopie am Hygiene-Institut der Universität Münster i. W. Dem Direktor, Herrn Prof. Dr. K. W. Jötten, danken wir für die Unterstützung der Untersuchungen seitens des Institutes.

#### Literatur

- Astbury, W. T., 1951: Some recent adv. among the proteins. Publ. staz. zool. Napoli 23 Suppl., 1—18.
- Bretschneider, L. H., 1950 a: Die Herstellung von dünnen Gewebsschnitten und ihre Untersuchung mit dem Elektronenmikroskop. *Mikroskopie* 5, 15—31.
- 1950 b: Elektronenmikroskopische Untersuchung einiger Ciliaten. *Mikroskopie* 5, 257—269.
- Chatton, E., et J. Séguéla, 1940: La continuité génétique des formations ciliaires chez les ciliés hypotriches. Le cinétome et l'argyrome au cours de la division. *Bull. biol. France-Belgique* 74, 349—442.
- Frey-Wyssling, A., 1948: Submicroscopic morphology of protoplasm and its derivatives. New York.
- Von Gelei, J., 1926: Zur Kenntnis des Wimperapparates. *Zeitschr. Anat. u. Entwicklungsgesch.* 81, 550—553.
- 1932: Die reizleitenden Elemente der Ciliaten in naß hergestellten Silber- bzw. Goldpräparaten. *Arch. Protistenkde.* 77, 152—174.
- 1939: Das äußere Stützgerüstsystem des *Paramecium*körpers. *Arch. Protistenkde.* 92, 245—273.
- 1940: Körperbau und Erregungsleitung bei den Ciliaten. Eine Studie an *Loxoccephalus* und einigen anderen Ciliaten. *Arch. Protistenkde.* 93, 273—316.
- Hartmann, M., 1947: Allgemeine Biologie. Jena.
- Houwink, A. L., and W. v. Iterson, 1950: Electron microscopical observations on bacterial cytology. II. A study on flagellation. *Biochim. Biophys. Acta* 5, 10—44.
- Klein, B. M., 1928: Die Silberliniensysteme der Ciliaten — weitere Resultate. *Arch. Protistenkde.* 62, 177—260.
- 1932: Das Ciliensystem in seiner Bedeutung für Lokomotion, Koordination und Formbildung mit besonderer Berücksichtigung der Ciliaten. *Erg. d. Biol.* 8, 75—179.
- 1939: Silberliniensystem und Cytophygenitätigkeit bei *Colpidium*. *Arch. Protistenkde.* 92, 401—407.
- 1942: Differenzierungsstufen des Silberlinien- oder neuroformativen Systems. *Arch. Protistenkde.* 96, 1—30.
- Krüger, Fr., und K. E. Wohlfarth-Bottermann, 1952: Elektronenoptische Beobachtungen an Ciliatenorganellen. *Mikroskopie* 7, 121—127.
- — und G. Pfefferkorn, 1952: Protistenstudien III. Die Trichocysten von *Uronema marinum* Dujardin. *Z. f. Naturforsch.* 7 b, 407—410.
- Lwoff, A., 1950: Problems of Morphogenesis in Ciliates. The Kinetosomes in Development, Reproduction and Evolution. New York-London.

- Maier, H. N., 1903: Über den feineren Bau der Wimperapparate der Infusorien. Arch. Protistenkde. 2, 73—179.
- Newman, S. B., E. Borysko and M. Swerdlow, 1949: New sectioning techniques for light and electron microscopy. Science 110, 66—68.
- Peter, K., 1898/99: Das Zentrum für die Flimmer- und Geißelbewegung. Anat. Anz. 15, 271—283.
- Pischinger, A., 1950: Über die Verwendungsmöglichkeit des Elektronenmikroskops in der zyto- und histologischen Forschung. Mikroskopie 5, 287—288.
- Pütter A., 1904: Die Flimmerbewegung. Erg. d. Physiol., II. Abt., II. Jahrg.
- Sedar, A. W., H. W. Beams and C. D. Janney, 1952: Electron microscope studies on the ciliary apparatus of the gill cells of *Mya arenaria*. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 79 (2), 303—305.
- Schmidt, W. J., 1937 a: Zur Doppelbrechung der Cilien. Protoplasma 28, 18—22.  
— 1937 b: Die Doppelbrechung von Karyoplasma, Zytoplasma und Metaplasma. Protoplasma-Monographien 11. Berlin.
- Schuberg, A., 1905: Über Cilien und Trichocysten einiger Infusorien. Arch. Protistenkde. 6.
- Taylor, C. V., 1929: The fibrillar system in Protozoa. Americ. Naturalist 63, 328—345.
- Ten Kate, C. G. B., 1927: 1. Über das Fibrillensystem der Ciliaten. Arch. Protistenkde. 57, 362—421.  
— Über das Fibrillensystem der Ciliaten. 2. Das Fibrillensystem der Isotrichen (*Isotricha* und *Dasytricha*). Arch. Protistenkde. 62, 328—354.
- Weisz, P. B., 1951: A general mechanism of differentiation based on morphogenetic studies in Ciliates. Americ. Naturalist 85, 293—311.
- Wohlfarth-Bottermann, K. E., 1952: Protistenstudien IV. Weitere Untersuchungen an Ciliaten-Cilien. Verh. Dtsch. Zoolog. Ges. (im Druck).
- Zahn, H., 1952: Über den Feinbau einiger Proteine. Angewandte Chemie 64, 295—308.

## Eiweißspindeln und cytoplasmatische Einschlußkörper in *Pereskia*

Von

Friedl Weber, Griseldis Kenda und Irmtraud Thaler

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Graz

Mit 4 Textabbildungen

(Eingelangt am 2. Dezember 1952)

Die Zahl der Cactaceen-Species, bei denen Eiweißspindeln im Cytoplasma gefunden wurden, ist nicht mehr gering. Molisch (1885) hat diese Gebilde bei *Epiphyllum truncatum* entdeckt, nach einem Bericht von Heinricher (1889) hat sie Leitgeb auch bei *Opuntia virens* gesehen, Mikosch (1908) fand sie bei *Pereskia aculeata*, Gicklhorn (1913) bei folgenden Opuntien: *O. missouriensis*, *monacantha*, *canandica*, *filipendula*, *Engelmanni*, *vulgaris*, *microdasys*, *Cylindrica*, *grandis*, *haematocarpa*, *robusta*, *spirocentra*, *fragilis* und *maxima*. Metcalfe and Chalk (1950) gibt „Protein-bodies“ für *Schlumbergera* und *Zygocactus* an. Neu sind die Befunde von Weber und Kenda (1952) an *Rhipsalis cereuscula* sowie von Weber, Kenda und Thaler (1952) an *Opuntia subulata*. Im folgenden wird darüber berichtet, daß Proteinspindeln auch bei *Pereskia pititache* vorkommen.

Aus diesen Angaben geht zunächst hervor, daß bei den Cactaceen Eiweißspindeln keine Seltenheit sind. Es finden daher auch diese Gebilde in Handbüchern der systematischen Pflanzenanatomie (Solereder 1899, Metcalfe and Chalk 1950) als ein anatomisches Merkmal dieser Familie Erwähnung. Und doch fragt es sich, ob es zulässig ist, den Besitz von „Proteinkörpern“ als art- bzw. familienspezifisches Merkmal anzuerkennen. Es hat sich nämlich gezeigt, daß immer nur manche Individuen einer Art diese Körper besitzen, andere Exemplare aber nicht. Mikosch (1908) gibt an, daß *Epiphyllum truncatum* nur dann Eiweißspindeln hat, wenn es auf einer Unterlage (*Pereskia aculeata*) gepfropft ist, die selbst solche Inhaltskörper besitzt. Rosenzopf (1951) hat dies bestätigt. Weber und Kenda (1952) und Kenda und Weber (1952) heben hervor, daß die *Opuntia-subulata*-Pflanzen, die seit langem im Grazer Botanischen Garten kultiviert werden, Proteinkristalloide haben, nicht aber die aus dem Botanischen Garten von Neapel stammenden. Auch von *Rhipsalis cereuscula* haben nicht alle Pflanzen die Eiweißspindeln (Weber, Kenda und Thaler 1952).



Die Eiweißspindeln treten also nicht immer, sondern nur unter gewissen Bedingungen in den Kakteenzellen auf. Die Bedingungen waren allerdings zunächst unbekannt. Rosenzopf (1951) hat durch Pfropf- und Impfversuche zu erweisen gesucht, daß die Proteingebilde nur dann vorhanden sind, wenn die Pflanzen virusinfiziert sind. Die Eiweißspindeln würden demnach als Virus-Einschlußkörper zu bezeichnen sein. Als Argumente, die zugunsten dieser Auffassung sprechen, läßt sich, abgesehen von den Ergebnissen der Pfropfversuche von Mikosch (1908) und Rosenzopf (1951), folgendes anführen:

1. Die Proteinkörper, über deren große Formenmannigfaltigkeit Weber und Kenda (1952) sowie Weber, Kenda und Thaler (1952) berichteten, haben häufig eine außerordentliche Ähnlichkeit mit Virus-Eiweißkörpern, wie sie für verschiedene viruskranke Pflanzen beschrieben sind (Lit. bei Bawden 1950, Esau 1941).

2. Abgesehen von den kristalloiden Einschlußkörpern sind in den Kakteenzellen auch noch protoplasmatische Einschlußkörperchen vorhanden nach Art der aus viruskranken Pflanzen bekannten X-bodies (vgl. insbes. die Arbeiten von Sheffield 1951, 1959, 1941).

3. Die Eiweißspindeln treten in der Epidermis der Pflanzen, in denen sie zu finden sind, trotz der Gleichartigkeit der gewöhnlichen Oberhautzellen meist nur in Zellinseln auf, in Zellgruppen daneben fehlen sie. Dieses Verhalten ist charakteristisch für das Vorkommen von Virus-Einschlußkörpern.

4. Eine befriedigende physiologisch-biologische Deutung für den Besitz der kristalloiden Proteinkörper in den Geweben der Kakteen läßt sich bisher nicht geben. Gegen die Auffassung, daß diese Gebilde Reservestoffe seien, spricht es, daß sie bei der Vergilbung der Blätter nicht verschwinden, vielmehr erhalten bleiben (Weber 1953).

Die Ansicht von Mikosch (1908), daß das Auftreten von Eiweißspindeln im Pfropfreis (*Epiphyllum*) dadurch zustande kommt, daß die spindelhaltige Unterlage (*Pereskia*) etwa auf enzymatischem Wege das Reis beeinflusse, ist deshalb abzulehnen, weil von dem Pfropfreis, wenn es einmal Eiweißspindeln aufweist, Stecklinge weiter gezogen werden können, die, obwohl sie dem Einfluß der Unterlage dann entzogen sind, doch immer wieder Eiweißspindeln bilden.

*Pereskopsis pititache* dürfte für das Studium der Einschlußkörper besonders geeignet sein. Die cytoplasmatischen Einschlußkörper (X-bodies) sind in den Zellen dieser Pflanze besonders groß und lassen sich an Flächenschnitten durch das Blatt lebend leicht untersuchen. Sie sind in größeren Blattpartien in Einzahl in jeder gewöhnlichen Epidermiszelle vorhanden, nur den Schließzellen fehlen sie<sup>1</sup>. Mit dem Zellkern sind die X-Körper nicht

<sup>1</sup> Daß in den Schließzellen der Stomata Viruskörper fehlen, hat schon Sheffield (1956) für viruskranke Solanaceen gezeigt. Das Fehlen der Einschlußkörper in den Schließzellen beweist aber nicht, daß in diesen Zellen kein Virus vorhanden ist. Auch Meristemzellen enthalten keine Viruskörper, und doch läßt sich mit meristematischem Gewebe Infektion hervorrufen (Sheffield 1942). Bei anderen viruskranken Pflanzen sind im übrigen auch in den Schließzellen Einschlußkörper nachzuweisen (Esau 1941, Kassanis and Sheffield 1941).

immer in Kontakt. Offenbar je nach ihrem Entwicklungsstadium ist das Aussehen der Einschlusskörper recht verschieden. Vor allem ist die Anzahl der von ihnen eingeschlossenen „Mikrosomen“ sehr variabel. Vakuolen größeren oder kleineren Umfanges sind in den X-bodies meist zu sehen; nicht selten tritt in ihrer Mitte eine einzige große Vakuole auf, die auffallenderweise nicht die sonst übliche runde Form aufweist, sondern poly-



Abb. 1. *Pereskiopsis pititache*. Lebende Epidermiszellen mit cytoplasmatischen granulären Einschlusskörpern.

gonal eckig konturiert ist; man muß annehmen, daß der Vakuole diese Form durch feste Partien des X-Körpers aufgezwungen wird. Die cytoplasmatischen Einschlusskörper sind bei Flächenschnitten durch die Epidermis von der Fläche zu sehen, und da sie meist kreisrunden Umfang haben, gewinnt man den Eindruck, sie seien Kugeln. Es dürfte dies aber nicht immer der Fall sein; sie sind vielmehr anscheinend häufig mehr oder weniger dicke flache Scheiben.

Damit erklärt es sich vielleicht, daß aus den X-bodies cytoplasmatische Ringe werden können. Vergrößert sich nämlich die zentrale Vakuole der X-Körper, so wird das granuläre Cytoplasma an die Peripherie der Vakuole gedrängt und aus der Scheibe wird ein Ring. Der vom Cytoplasmaring eingefasste Raum erscheint optisch leer, er ist aber vielleicht von einer ganz zarten Plasmahaut umspannt, die allerdings nicht sichtbar ist<sup>2</sup>. Die-

<sup>2</sup> Diese Vorstellung über die Entstehung der cytoplasmatischen Ringe ist allerdings hypothetisch. Es wäre auch möglich, daß die X-bodies, die sich nicht selten spindelförmig verlängern, die Tendenz haben, sich ringförmig einzukrümmen; dann wäre das Zustandekommen der Ringe auch ohne Beteiligung einer Vakuole möglich.

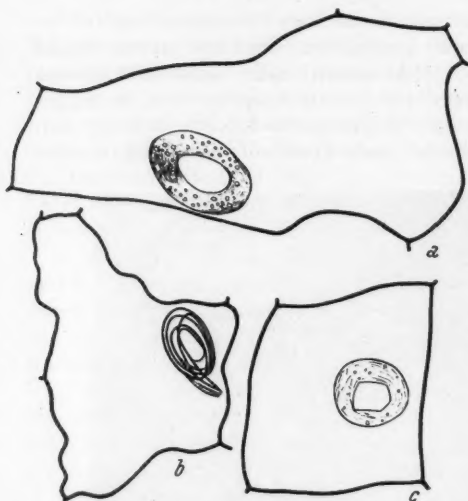


Abb. 2. *Pereskia pititache*. Epidermiszellen mit ringförmigen cytoplasmatischen Einschlusskörpern.

ser cytoplasmatische X-Körper-Ring erinnert zwar seiner Gestalt nach ganz an die bekannten Ringformen, welche die Eiweißspindeln von *Epiphyllum* und *Opuntia* annehmen können, die Spindelringe zeigen aber einen kompakten, nicht granulären Bau und kommen wohl auch anders zustande. Die Entstehungsweise der Spindelringe ist allerdings noch nicht geklärt, denn eine passive Einkrümmung aus Raumangel, wie man früher vermutet hat, ist nicht immer anzunehmen (Weber und Kenda 1952).

Die cytoplasmatischen Einschlusskörper von *Pereskia* lassen neben

ihrem granulären oder vakulären Bau nicht selten sehr deutlich das Auf-

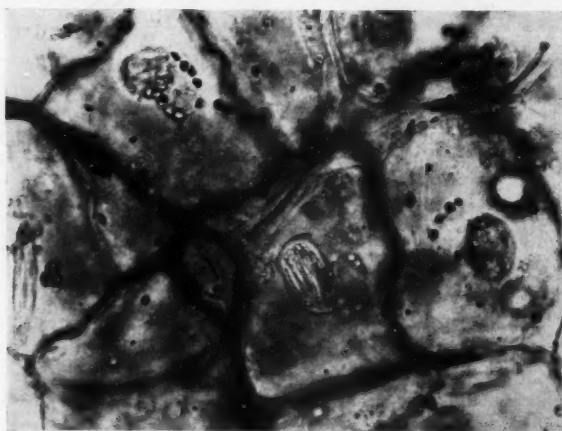


Abb. 3. *Pereskia pititache*. Lebende Epidermiszellen; in zwei X-bodies sind Eiweißkristalloide zu sehen. Der Zellkern ist umgeben von kleinen Plastiden.

treten von Stäbchen oder Spindeln in ihrem Innern erkennen. Es sind dies doppelbrechende Eiweißkristalloide. Solange sie klein sind, werden sie

ganz vom X-Körper eingeschlossen, wenn sie größer werden, ragen einzelne Spieße aus dem cytoplasmatischen Einschlusskörper heraus. Die Eiweißkristalloide können in mehr oder weniger großer Zahl im X-Körper eingeschlossen liegen, jedes für sich isoliert, die Eiweißstäbchen können aber auch miteinander zu einem Gerüstwerk vereinigt zusammenhängen und so ein Retikulum bilden, dieses Netz gibt so wie die Einzelspindeln Eiweißreaktionen.

Wenn die X-Körper älter werden, verschwinden die in ihnen enthaltenen Granula immer mehr, und es bleibt schließlich nur mehr ein Bündel von Eiweißkristalloiden oder das Eiweißretikulum übrig<sup>3</sup>.

Diese Eigenschaften der cytoplasmatischen Einschlusskörper von *Pereskiopsis* entsprechen vollkommen der eingehenden Darstellung, die Sheffield (1934 und später) für die „virus inclusion bodies“ infizierter Solanaceenzellen gegeben hat.

Da man derartige cytoplasmatische Einschlusskörper, aus denen Eiweißspindeln entstehen, bisher nur in virusinfizierten Zellen gefunden hat, so darf im Auftreten solcher Gebilde in Kakteenzellen wohl ein wichtiges Argument dafür erblickt werden, daß diese Kakteen mit Virus infiziert sind.

Außerlich zeigen die Pflanzen zwar häufig keine auffallenden Krankheitssymptome, doch wird erst eine daraufhin gerichtete Beobachtung ergeben, ob diese Virusträger wirklich „symptomlos“ sind. Die Kakteen unserer Gewächshäuser zeigen oft ein wenig freudiges Gedeihen; gewiß kann dies auf ungünstige Kulturbedingungen zurückgehen, es könnte aber an diesem kümmerlichen Aussehen wohl auch das Virus, das sie enthalten, schuld sein, ein Krankheitserreger, der ja gerade bei Pflanzen alle Übergänge von Latenz bis zur Hochvirulenz aufweisen kann.

Wenn die Eiweißspindeln und die X-Körper als mikroskopisch sichtbare Symptome zu bewerten sind, dann dürfte es sich empfehlen, auch noch nach anderen mikroskopischen Symptomen zu suchen. Weber und Kenda (1952) haben darauf aufmerksam gemacht, daß bei Kakteen, die im Verdacht stehen, virusinfiziert zu sein, die Spaltöffnungsapparate durch Membranwucherungen deformiert und außer Funktion gesetzt werden. Gerade bei der X-Körper aufweisenden *Pereskiopsis* fällt es auf, daß fast alle Spaltöffnungsapparate infolge von Membranwucherungen nicht in Ordnung sind. Es fällt auch auf, daß bei solchen Pflanzen in den Schließzellen häufig rote Kristalle von Kaktorubin zu sehen sind. Diese Substanz



Abb. 4. *Pereskiopsis pititache*. Blattepidermiszelle mit retikulärem X-Körper.

<sup>3</sup> Heute, kaum mehr bekannt ist es, daß Mikosch bereits 1890 bei *Oncidium microchilum* die Bildung von Eiweißkristalloiden aus granulären Cytoplasma-Massen beschrieben hat. Diese Cytoplasma-Anhäufungen, die Mikosch auch abgebildet hat, würde man heute als X-bodies bezeichnen. Das von ihm untersuchte Exemplar von *Oncidium* war offenbar ein symptomloser Virusträger.

tritt nach Molisch (1928) in Kakteen nach Verletzungen auf, Weber und Kenda (1952) haben Kaktorubin in viruskranken *Rhipsalis*-Pflanzen gefunden. Daß die Bildung der Kaktorubinkristalle bei *Pereskia* (bei Fehlen äußerer Verletzungen) auf die Schließzellen beschränkt ist, spricht dafür, daß gerade diese Zellen durch das Virus stark geschädigt sind.

Der Kakteenzüchter, der für das schlechte Gedeihen seiner Pflanzen einen Grund sucht, wird vielleicht gut tun, sie auf das Vorkommen von Stomataanomalien und von X-Körpern oder Eiweißspindeln zu untersuchen. Wenn auch die Aussichten, Phytoviren auszuheilen, gering sind, so müßte es doch wenigstens vermieden werden, auf Virusträger (z. B. *Pereskia*) virusfreie Kakteen aufzupfropfen und dadurch das Reis der Infektion auszuliefern. Auch wird es sich nicht empfehlen, *Epiphyllen* mit Eiweißspindeln auf vegetativem Wege fortzupflanzen, da sich bei vegetativer Vermehrung die zunächst nicht auffallenden Krankheitssymptome verstärken dürften.

Die Gewebe von *Epiphyllum*-Pflanzen, die schon äußerlich krank aussehen (schlaflige Sprosse, runzelige Haut, einzelne braune nekrotische Flecke, graugrüne Färbung), zeigen sich mit Eiweißspindeln besonderer Größe förmlich überschwemmt. Es ist begreiflich, daß Pflanzen, bei denen offenbar der größte Teil des Cytoplasma-Eiweiß in Virusweiß umgewandelt ist, kein freudiges Gedeihen zeigen können.

### Zusammenfassung

In den Epidermiszellen der Blätter von *Pereskia pititache* finden sich Einschlusskörper, die kugelig-, scheiben-, spindel- oder ringförmig sein können. In diesen zunächst cytoplasmatischen, granulären, vakuolären Gebilden entstehen Eiweißspindeln, die beim allmählichen Verschwinden der cytoplasmatischen Einschlusskörper diese überdauern. Da solche zur Kristallisation neigende Einschlusskörper nur aus Zellen viruskranker Pflanzen als X-bodies bekannt sind, so darf angenommen werden, daß die untersuchten Pflanzen von *Pereskia pititache* sowie Exemplare anderer Kakteen, die Eiweißspindeln und X-bodies enthalten, Virusträger sind. Die X-Körper und Eiweißspindeln sind demnach auch bei Kakteen als diagnostisches Merkmal einer Viruserkrankung zu werten.

### Literatur

- Bawden, 1950: Plant Viruses and Virus Diseases. Waltham, Mass.  
 Esau, 1941: Inclusions in guard cells of tobacco affected with mosaic. *Hilgardia* 40.  
 Gicklhorn, 1913: Über das Vorkommen spindelförmiger Eiweißkörper bei *Opuntia*. *Österr. Bot. Z.* 63.  
 Heinricher, 1889: Hubert Leitgeb. *Mitteil. Naturw. Verein Steiermark* 1888.  
 Kassanis und Sheffield, 1941: Variations in the cytoplasmic inclusions induced by three strains of tobacco mosaic virus. *Annals Applied Biol.* 28.  
 Kenda und Weber, 1952: Stomata-Anomalie von *Opuntia*-Virusträgern. *Österr. Bot. Z.* 100.



- Metcalfe and Chalk, 1950: Anatomy of the Dicotyledones. I. Oxford.
- Mikosch, 1890: Über ein neues Vorkommen geformten Eiweißes. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 8.
- 1908: Über den Einfluß des Reises auf die Unterlage. In Linsbauer: Wiesner-Festschrift. Wien.
- Molisch, 1885: Über merkwürdig geformte Proteinkörper in den Zweigen von *Epiphyllum*. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 3.
- 1928: Über ein bei den Kakteen vorkommendes, einen roten Farbstoff lieferndes Chromogen. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 46.
- Rosenzopf, 1951: Sind Eiweißspindeln Virus-Einschlusskörper? Phyton 3.
- Sheffield, 1951: The Formation of Intracellular Inclusions in Solanaceous Hosts Infected with *Aucuba* Mosaic of Tomato. Annals Applied Biol. 18.
- 1936: The Role of Plasmodesms in the Translocation of Virus. Annals Applied Biol. 23.
- 1939: Microgical Studies on Virus-Infected Plants. Proceed. R. Soc. London Ser. B. 126.
- 1942: Presence of Virus in the Primordial Meristem. Annals Applied Biol. 29.
- Solereder, 1899: Systematische Anatomie der Dicotyledonen. Stuttgart.
- Weber und Kenda, 1952: Cactaceen-Virus-Eiweißspindeln. Protoplasma 41.
- , Kenda und Thaler, 1952: Viruskörper in Kakteen-Zellen. Protoplasma 41.
- und Kenda, 1952: Die Viruskörper von *Opuntia subulata*. Protoplasma 41.
- 1953: Eiweißspindeln (Viruskörper) in vergilbenden *Pereskia*-Blättern. Österr. Bot. Z. 100.

## Schließzellen-Chloroplasten vergilben nicht

Von

Griseldis Kenda, Irmtraud Thaler und Friedl Weber

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Graz

Mit 1 Textabbildung

(Eingelangt am 22. Oktober 1952)

„In Zellen, deren Leben seinem physiologischen Ende entgegengeht, führt die Wandlung der Chloroplasten zu Chromoplasten zum Phänomen der herbstlichen Verfärbung... Die Vergilbung der Blätter wird in erster Linie durch den Schwund des Chlorophylls bewirkt, doch ist der gelbe Farbstoff vergilbter Blätter nicht identisch mit dem der grünen Blätter“ (Küster 1951: 348). Die Schließzellen lebensaktiver Blätter sind in der Regel ausgezeichnet durch den Besitz intensiv grüner Chloroplasten. Da die Stomazellen vielerlei physiologisch-protoplasmatische Eigenheiten aufweisen (Weber 1927), war es fraglich, ob die Chloroplasten der Schließzellen bei der Vergilbung der Blätter die Metamorphose in Chromoplasten, wie sie in den anderen grünen Blattzellen vor sich geht, mitmachen.

Ein günstiges Untersuchungsobjekt für diese Frage bot sich in den Blättern von *Pereskia aculeata* dar, die vor dem Laubfall eine intensiv gelbe Färbung annehmen. Schnitte ließen erkennen, daß in den gewöhnlichen Epidermiszellen sowie in den Mesophyllzellen mit karotینگelben Tröpfchen durchsetzte Reste von Chromoplasten vorhanden sind, die Plastiden der Schließzellen jedoch die grüne Farbe behalten haben. Eine Untersuchung im Fluoreszenzmikroskop ergab, daß die Plastiden der Schließzellen die rote Chlorophyll-Fluoreszenz zeigen, die der anderen Epidermiszellen nicht mehr. Mit Silbernitratlösung behandelt, schwärzen sich nur die Plastiden der Schließzellen, ein Zeichen, daß nur diese Chlorophyll enthalten (Molisch 1918a, b)<sup>1</sup>.

Es war nicht unsere Absicht, vergilbte Blätter einer großen Zahl von Arten zu untersuchen, es sei nur erwähnt, daß sich in vergilbten Blättern u. a. folgender Pflanzen Schließzellen mit grünen Plastiden fanden: *Convallaria majalis*, verschiedene *Iris*-Arten und *Hemerocallis flava*. Die Schließzellen der Blätter von Holzgewächsen, wie *Aesculus Hippocastanum*, *Acer*-Arten, *Carpinus Betulus*, *Betula*-Arten, sind in der Regel, sobald die Blätter vergilbt sind, bereits abgestorben.

<sup>1</sup> Über die Reduktion wäßriger Silbernitratlösungen vgl. auch Metzner 1952.

Bei den Angiospermen sind die Plastiden der gewöhnlichen Epidermiszellen in der Regel klein und chlorophyllarm, die der Stomazellen häufig größer und stärker pigmentiert. Man könnte vermuten, daß schon deshalb die Chloroplasten der Epidermiszellen rascher vergilben als die der Schließzellen. Bei den Pteridophyten dagegen sind auch die gewöhnlichen Oberhautzellen mit großen, chlorophyllreichen Plastiden versehen. Es wurde an einigen Arten untersucht, wie es mit dem Vergilbungsprozeß der Epidermis- und Schließzellen bei diesen Pflanzen aussieht.

Die Blätter von *Pteridium aquilinum* vergilben im Herbst, bevor sie absterben und braun werden. Die Vergilbung geht nicht selten in eine Ausbleichung über, wobei auch die Gelbfärbung verlorengeht und die Blätter bleich, fast farblos werden. Im Zeitpunkt der Vergilbung sind in den Epidermiszellen von *Pteridium* nur mehr gelbe Reste der zu Chromoplasten gewordenen Chloroplasten vorhanden, die

Schließzellen-Plastiden sind noch grün und verschwinden schließlich beim völligen Ausbleichen der Blätter, ohne daß sie sich vorher in Chromoplasten umgewandelt hätten. Ähnlich verhalten sich die Schließzellen-Chloroplasten von *Athyrium Filix-femina*

und *Dryopteris Filix-mas*. Bei *Adiantum pedatum* sind im grünen Zustand des Blattes die Schließzellen-Chloroplasten schwächer grün als die intensiv grünen Chloroplasten der Epidermiszellen. Im vergilbten Zustand des Blattes besitzen die gewöhnlichen Epidermiszellen kein Chlorophyll mehr, die Schließzellen sind unverändert grün geblieben.

Das Unterbleiben der Metamorphose der Plastiden von Chloroplasten in Chromoplasten in den Schließzellen ist offenbar nicht auf den Prozeß der Altersvergilbung beschränkt. Schittengruber (1953) hat festgestellt, daß in den Schließzellen der Blütenblätter von *Caltha palustris* bei der Entwicklung der Knospe zur geöffneten Blüte keine Umwandlung der Chloroplasten in Chromoplasten vor sich geht, während die anderen Epidermiszellen des Perianths ihr Chlorophyll einbüßen und durch Karotinbildung orangegelb gefärbte Chromoplasten erhalten.

Der Kelch von *Physalis Alkekengi*, der zur Zeit der Blüte grün ist, nimmt im Herbst, wenn die Frucht reift, eine intensiv rot-gelbe Färbung an. In

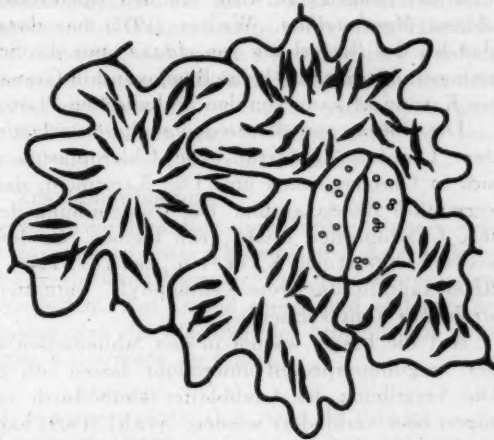


Abb. 1. Epidermis des rot gefärbten Kelches von *Physalis Alkekengi*. In den gewöhnlichen Epidermiszellen intensiv rote große Chromoplasten, in den Schließzellen kleine blaßgrüne Chloroplasten.

den Epidermiszellen haben sich die Chloroplasten zu prächtig gefärbten großen Chromoplasten umgewandelt. Die Schließzellen sind dagegen grün geblieben, sie haben kein Karotinoid ausgebildet (Abb. 1). Es handelt sich hier um Kryptoxanthin (Karrer u. Jucker 1948).

Die Blätter mancher Pflanzen haben die Eigentümlichkeit, daß sie sich unter dem Einfluß winterlicher Temperaturen rötlich verfärben, im Frühjahr aber ihre grüne Farbe wieder erhalten. Diese winterliche Verfärbung beruht darauf, daß sich die Chloroplasten in Chromoplasten umwandeln, und zwar durch Ausbildung eines speziellen Karotinoids des Rhodoxanthins (Lipmaa 1925, 1926), das in Form roter Grana im grünen Stroma der Plastiden eingelagert wird. Zu den Rhodoxanthin-Pflanzen gehört auch *Adoxa Moschatellina*. Weber (1937) hat darauf aufmerksam gemacht, daß bei der Rotfärbung von *Adoxa* „nur die Schließzellen-Chloroplasten“ rein grün bleiben und keine Rhodoxanthin-Grana ausbilden. Also auch dieses Karotinoid kann von den Schließzellen-Plastiden nicht gebildet werden.

Die Blätter von *Metasequoia glyptostroboides* werden im Herbst vor dem Laubfall kupferrot. Die Chloroplasten des Mesophylls wandeln sich in Chromoplasten um. Das Karotinoid, das dabei gebildet wird, ist vermutlich Rhodoxanthin. Die Untersuchung der Stomazellen ergab, daß ihre Chloroplasten intakt grün bleiben. In dem Verzeichnis, das Zechmeister (1934) und Karrer u. Jucker (1948) von Pflanzen bringen, die Rhodoxanthin, das „rote Xanthophyll“, enthalten, ist *Metasequoia glyptostroboides* nicht vermerkt.

Auf die Frage, warum in den Schließzellen und gerade nur in diesen der Vergilbungsprozeß unterbleibt, lassen sich nur Vermutungen äußern. Die Vergilbung der Laubblätter kann durch verschiedene Eingriffe verzögert oder verhindert werden. Stahl (1909) hat durch rechtzeitige Unterbindung der Leitungsbahnen das herbstliche Gelbwerden der Blätter von *Ginkgo biloba* in bestimmten Partien verhindert, Cornu (1881) behandelt den Fall einer Prolongation de l'activité des cellules chlorophylliennes sous l'influence d'un parasite (siehe Küster 1916: 221). Man könnte daran denken, daß die Schließzellen von den übrigen Blattzellen so isoliert sind, daß sie den inneren Faktoren, die die Vergilbung veranlassen, entzogen bleiben. Es wurde ja vielfach behauptet, daß zwischen Schließ- und Epidermiszellen die Plasmodesmen fehlen (Lit. bei Weber 1931).

Man könnte auch daran denken, daß die Schließzellen, denen ja in verschiedener Hinsicht erhöhte Lebensaktivität und Resistenz zukommt (Lit. bei Weber 1927), dem Alterungsprozeß, der zur Reifung und Vergilbung (Umwandlung von Chloroplasten in Chromoplasten) bei anderen Zellen führt, nicht so bald oder überhaupt nicht unterworfen sind. Nicht zugunsten dieser Deutungen spricht es aber wohl, daß auch die Rotfärbung durch Rhodoxanthin in den Schließzellen nicht stattfindet. Die winterlichen Temperaturen, die diese reversible Chromoplastenbildung veranlaßt, treffen ja die Schließzellen direkt, auch handelt es sich dabei keineswegs um einen Alterungsprozeß.

Man muß sich demnach vorläufig mit der Feststellung begnügen, daß bei den daraufhin untersuchten Pflanzen die Schließzellen-Chloroplasten

unter Bedingungen, unter denen die Chloroplasten der anderen Blattzellen sich in Chromoplasten umwandeln, diesen Prozeß nicht mitmachen. Ob man daraus schließen darf, daß dies eine Eigentümlichkeit der Stoma-Plastiden selbst ist, bleibt fraglich, denn es könnte ja auch primär eine spezifische Eigenheit des Schließzellen-Cytoplasmas daran schuld sein. Den Schließzellen-Plastiden gehen allerdings auch andere Fähigkeiten ab, so die der Ausgestaltung zu Proteinoplasten (Thaler 1953).

Lipmaa (1926) unterscheidet zwei Typen von Karotinoiden: Hämatokarotinoide, zu denen z. B. das Rhodoxanthin gehört, und die gelben Chlorophyllbegleiter Xanthokarotinoide (Xanthophylle, Karotine). Nach den hier mitgeteilten Beobachtungen scheint also den Schließzellen-Plastiden die Fähigkeit abzugehen, Xanthokarotinoide sowie auch Hämatokarotinoide in dem Maße auszubilden, daß sie zu Chromoplasten werden. Der Nachweis, ob die Chloroplasten der Schließzellen überhaupt Xanthokarotinoide als Chlorophyllbegleitfarbstoffe enthalten, steht noch aus. Nach Tswett (1908) und Molisch (1918) sind die Karotinoide der vergilbten Blätter nicht identisch mit denen der grünen Blätter.

### Zusammenfassung

Die vergilbten Blätter einer Reihe daraufhin untersuchter Pflanzen enthalten in den Schließzellen unverändert grüne Chloroplasten. Es geht demnach in den Stomazellen die (herbstliche) Metamorphose der Chloroplasten in Chromoplasten nicht vorstatten. Auf Grund dieser und anderer Beobachtungen wird angenommen, daß die Plastiden der Schließzellen nicht befähigt sind, Chromoplasten-Karotinoide zu bilden.

### Literatur

- Cornu, 1881: Prolongation de l'activité végétale. C. R. Acad. Sc. Paris 93.  
Karrer u. Jucker, 1948: Carotinoide. Basel.  
Küster, 1916: Pathologische Pflanzenanatomie. 2. Aufl. Jena.  
— 1951: Die Pflanzenzelle. 2. Aufl. Jena.  
Lipmaa, 1925: Das Rhodoxanthin. Schr. Naturforsch. Ges. Univ. Tartu 24.  
— 1926: Über den vermuteten Rhodoxanthingehalt der Chloroplasten. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 44.  
Metzner, 1952: Die Reduktion wäßriger Silbernitratlösungen durch Chloroplasten und andere Zellbestandteile. Protoplasma 41.  
Molisch, 1918a: Über das Chlorophyllkorn als Reduktionsorgan. Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien, math.-nat. Kl., 127.  
— 1918b: Über die Vergilbung der Blätter. Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien, math.-nat. Kl., 127.  
Schittengruber, 1953: Chromoplasten fehlen den Schließzellen. Protoplasma 42.  
Stahl, 1909: Zur Biologie des Chlorophylls. Jena.  
Thaler, 1953: Proteinoplasten fehlen den Schließzellen. Protoplasma 42.  
Tswett, 1908: Über die Verfärbung und die Entleerung des absterbenden Laubes. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 26.  
Weber, 1927: Die Schließzellen. Arch. exp. Zellforschung 3.  
— 1937: Plastiden-Studien. Protoplasma 28.  
— 1951: Viruskörper fehlen den Stomazellen. Protoplasma 40.  
Zechmeister, 1934: Carotinoide. Berlin.



### Sammelreferate

## **Le comportement de la cellule végétale en présence de toxiques additionnés de substances tensio-actives**

Par

**A. Mirimanoff, Genève (Suisse)**

Avec 1 figure

(Reçu le 11 novembre 1952)

Au cours de ces dernières années, l'industrie chimique a synthétisé un nombre très élevé de substances désignées sous les noms de mouillants, tensio-actifs, détersifs, etc. La plupart de ces corps sont utilisés à des fins techniques, et, pour ne citer qu'un exemple, une catégorie de ces mouillants (anioniques surtout) fait une concurrence des plus sérieuses au savon aux U.S.A.

L'importance économique de ces applications explique peut-être le rôle beaucoup plus modeste que jouent ces substances en biologie.

Des trois classes de substances tensio-actives — les mouillants anioniques, cationiques et non ioniques — la seconde, connue également sous le nom d'« Invertseifen » et de bases quaternaires d'ammonium, appartient aux substances antiseptiques, car douée d'une action bactéricide et fongicide puissante.

Au point de vue de leurs propriétés toxiques, en dehors de l'action germicide des cationiques, il a été établi que les dérivés non ioniques sont généralement atoxiques pour l'homme et les animaux, et l'addition de quelques-uns de ces dérivés est tolérée, dans certains pays, à des produits alimentaires ou pharmaceutiques. Leur grand pouvoir de dispersion a incité Dubos à ajouter un mouillant non ionique connu sous le nom de Tween à des milieux de culture destinés au développement in vitro du bacille de la tuberculose.

Les mouillants anioniques, moins connus, semblent occuper une position intermédiaire en ce qui concerne leur toxicité vis-à-vis de l'homme et des animaux.

Quant au comportement de ces substances vis-à-vis de la cellule végétale, à part un certain nombre d'observations assez disparates concernant surtout les bactéries, il est beaucoup plus malaisé de s'en faire une idée à l'heure actuelle, ce qui nous a engagé de tenter un exposé d'ensemble résultant de nos recherches personnelles, compte tenu des données de la littérature. Le problème, des plus complexes, présente un intérêt incontestable, car il

permet d'aborder par des chemins peu battus, la question du mécanisme de la synergie et de l'antagonisme, si l'on associe à ces mouillants différentes catégories de substances toxiques.

### Le problème et ses variables

L'enquête expérimentale proposée — la réaction de la cellule végétale en présence de substances tensio-actives et de substances toxiques — nécessite des séries de recherches bien coordonnées. Il convient, dans les grandes lignes, de faire varier :

- a) la nature du mouillant (anionique, cationique, non ionique),
- b) la cellule végétale (phanérogame, bactéries, algues, champignons, etc.),
- c) le toxique.

Le mode opératoire ainsi que l'analyse des résultats seront subordonnés à ces variables. C'est ainsi que pour la cellule d'un végétal supérieur, les méthodes cytologiques telles que la plasmolyse rendront compte de l'état pathologique ou léthal, en l'absence d'un milieu de culture indispensable à la croissance des bactéries et des champignons; technique précieuse, car évitant des interférences toujours possibles entre milieux et substances chimiques. Des essais de germination ainsi que la culture en eau (« hydroponics ») et en pleine terre compléteront ces essais sur les phanérogames. Dans ce dernier cas, les phénomènes encore mal connus de l'adsorption des fongicides par le sol devront être étudiés à part.

En présence de phénomènes d'antagonisme avec l'association mouillants-antiseptiques, des méthodes d'analyse chimique seront établies pour faire la part due à une réaction possible entre les deux composants de cette association, nécessitant parfois l'élaboration de procédés de dosage assez délicats.

Il n'appartient pas à cet exposé de décrire les détails de technique expérimentale qui ont été élaborés par nos collaborateurs et par nous-même. Ils ont été publiés ailleurs et nous estimons plus utile, en résumant l'essentiel de nos recherches, d'en discuter les résultats.

### Toxicité pour la cellule végétale des mouillants seuls

Cette enquête, relativement aisée, doit précéder logiquement toute recherche où l'association d'un mouillant à un toxique entre en jeu. Nous pouvons résumer nos résultats expérimentaux comme suit :

#### a) Mouillants anioniques

Ces substances comportent une molécule dont la partie active est chargée négativement, comme par exemple le laurylsulfate de sodium, dont l'anion se compose d'une chaîne sulfohydrocarbonée.

Utilisés seuls en solution aqueuse, ces mouillants manifestent une toxicité variable vis-à-vis de la cellule végétale, et ceci, en fonction de la nature de la molécule du mouillant, comme de celle de la cellule. Ainsi, le radical cétyle est pratiquement atoxique, alors que le reste lauryle possède une certaine activité.

La plus sensible des cellules végétales par nous étudiée s'est révélée être celle de *Spirogyra* : cette algue est tuée en 24 heures de contact avec une solution aqueuse contenant  $1/10^3$  de laurylsulfate de Na (le plus actif des mouillants anioniques utilisés).

Les bactéries manifestent un comportement également variable : Si *B. subtilis* se montre très sensible (action bactériostatique du laurylsulfate de Na à 1/50 000), *Staph. aureus* et *E. Coli* supportent facilement une concentration de ce mouillant s'élevant à 1/1000.

Les champignons, plus sensibles que les bactéries, du moins pour les espèces étudiées, présentent également des variations. Pour le laurylsulfate de Na, les concentrations toxiques oscillent entre 1/2000 (*Mucor pusillus*), 1/10 000-20 000 (*Penicillium*, *Aspergillus niger*) et 1/100 000 (*Achorion Quinckeanum*, *Saprolegnia*, etc.). Avec ces végétaux également, le radical cétyle manifeste une quasi atoxicité.

Les végétaux supérieurs, enfin, paraissent plus résistants que les champignons. Soumis à des conditions expérimentales très sévères, telles que la culture permanente en milieu liquide artificiel (pendant 15 jours), ou encore contact direct de graines en germination avec le mouillant anionique, les organes les plus sensibles tels que les méristèmes de racines et les poils absorbants s'accommodent d'une concentration relativement élevée en laurylsulfate de Na, soit 1/5000. Les cellules d'*Elodea canadensis* immergées dans une solution aqueuse de ce mouillant à 1/1000 plasmolysent normalement après 24 heures, sans cessation des mouvements cytoplasmiques.

L'intérêt de ces dernières constatations apparaîtra dans la suite de cet exposé.

#### b) Mouillants cationiques

Ces substances bactéricides et fongicides efficaces sont douées d'une action toxique très générale. Ainsi, le « Désogène » (méthosulfates de triméthylammonium) tue la cellule d'*Elodea* à la concentration de 1/100 000 en 24 heures et en 2 heures à 1/10 000. A la concentration de 1/40 000 il se montre fongistatique pour *Aspergillus niger*, champignon relativement résistant.

La nature de la cellule végétale, contrairement à ce qui se passe avec les substances anioniques, semble ne jouer aucun rôle; le mouillant se comporte à la façon d'un poison protoplasmique.

#### c) Mouillants non ioniques

Ces substances qui ne contiennent pas de groupes ionisables se composent en général d'esters de polyalcools, liés ou non à des produits de polymérisation de l'oxyde d'éthylène. En dehors de leurs propriétés physiques qui les rapprochent des autres mouillants, ils présentent l'avantage, de par leur manque d'affinités chimiques, de rester compatibles avec une foule de substances chimiques.

L'atotoxicité de ces substances a été établie à plusieurs reprises par différents auteurs vis-à-vis d'animaux à sang chaud; nous l'avons confirmée avec le cyprin doré.

Les cellules végétales les plus diverses démontrent également l'atotoxicité de ces dérivés, en particulier des « Tween » N°s 20 et 80, ces derniers corps se révélant d'un emploi commode en raison de leur hydrosolubilité. Aucune influence n'est exercée par une solution aqueuse de Tween à 1% sur la cellule d'*Elodea* ou sur la germination d'une racine.

En revanche, nous avons confirmé le fait signalé par la littérature que ces dérivés favorisent le développement des champignons, agissant, à la

concentration de 1—2% par exemple, comme un véritable stimulant de la croissance mycélienne (poids du mycelium doublé ou triplé au bout de 10 jours, par rapport aux témoins).

Il se peut que cette action soit due à la présence d'acide oléique libéré de ces mouillants; cet acide se comporte lui-même à la façon d'un facteur de croissance, pour certains microorganismes.

Nous reviendrons par la suite sur cette propriété si particulière des mouillants non ioniques.

### Propriétés physiques communes aux substances mouillantes

En présence de propriétés biologiques si foncièrement différentes, allant de la toxicité élevée (cationiques) à la stimulation de la croissance (non ionique), il convenait d'élucider si leurs propriétés physiques permettaient d'apparenter ou de séparer les mouillants auxquels nous avons eu recours dans ces recherches. Les plus frappantes de ces propriétés physiques concernent la tension superficielle et le pouvoir « mouillant » proprement dit. A cet effet, une série de déterminations ont été entreprises (pouvoir mouillant : test de Draves, et mesure de la tension superficielle : tensiomètre du Noüy) sur six mouillants appartenant à ces 3 catégories.

Les constatations ne laissent aucun doute : il n'existe pas de relation entre la toxicité d'une part et la tension superficielle ou le pouvoir mouillant d'autre part. Ainsi, pour se limiter à un seul exemple, le Désogène à 1‰, très toxique, possède la même tension superficielle (33,7 dynes/cm) que l'inoffensif Crillex 11 de même concentration. Ce fait a du reste reçu diverses confirmations récentes.

### Les substances toxiques (antiseptiques) mises en œuvre

A la suite des travaux de Fildes, confirmés et complétés par une foule de publications subséquentes, il est devenu banal de constater combien varié se révèle le mécanisme de l'action toxique. Que celle-ci se manifeste en dénaturant les protides constitutifs de la cellule ou par une réaction entre le toxique et un métabolite essentiel à un processus enzymatique vital ou par une autre voie encore, un fait est certain : la nature chimique du toxique joue un rôle essentiel, et ceci oblige l'expérimentateur à faire un choix de substances différant profondément les unes des autres. Il faut tenir compte aussi des possibilités réactionnelles entre le toxique et la substance tensio-active.

Dans la plupart de nos expériences, nous avons eu recours aux substances suivantes : le borate de phénylmercure, l'un des plus puissants des bactériostatiques connus, le sulfate d'oxyquinoléine, bactéricide et fongicide classique, le dioxyhexachlorodiphénylméthane (connu aussi sous le nom de G 11 ou hexachlorophène), antiseptique récemment introduit, le dioxydichlorodiphénylméthane (G 4) corps voisin à action surtout fongicide, et dans certains cas particuliers, le sulfate de cuivre, l'hexanoate de cuivre, la juglone, la nipagine, l'hexylrésorcine, le mercurochrome, etc.

Le mode opératoire est le même que précédemment : il consiste à déterminer la limite de toxicité de ces diverses substances vis-à-vis d'un certain nombre d'espèces d'algues, de bactéries, de champignons et de végétaux supérieurs.

Cette toxicité est en général connue, nous l'avons cependant établie pour chaque cas particulier, avec notre mode opératoire propre dans le but de disposer de termes de comparaison sûrs, avant d'associer à ces toxiques les mouillants, but principal de nos recherches.

### Association d'un mouillant à un toxique (antiseptique)

Pour la clarté de l'exposé d'ensemble, nous résumerons les résultats de nos recherches en les divisant en trois parties, correspondant aux trois classes de mouillants; chacune de ces parties tiendra compte de la nature de la cellule végétale, facteur essentiel en vue de la discussion.

#### 1) Mouillant anionique associé à un toxique

##### a) Comportement d'un végétal supérieur

Ce cas est simple: l'addition à un toxique d'un mouillant anionique ne modifie en rien l'action létale de ce toxique. Ceci est vrai, dans nos expériences, en mettant en œuvre trois mouillants différents appartenant à cette catégorie (dioctylsulfosuccinate de Na<sup>1</sup>, laurylsulfate de Na<sup>2</sup> et un alkyl-phényl-sulfonate<sup>3</sup>, ainsi que plusieurs toxiques (voir plus haut) en essayant les diverses associations, 2 à 2. Qu'il s'agisse de la cellule de la feuille d'*Elodea*, des méristèmes de racine du blé ou de la culture en eau du haricot, il ne se produit ni synergie ni diminution de la toxicité. Un de nos collaborateurs a, tout récemment, cultivé en serre du cresson et de la laitue, en utilisant comme eau d'arrosage une solution de deux fongicides différents (G 4 et sulfate d'oxyquinoléine) additionnée de laurylsulfate de Na. La toxicité de ces substances n'a pas été modifiée. Fait intéressant, quoique en dehors du cadre de ce présent exposé: la substance tensio-active se révèle capable d'influer assez fortement sur l'adsorption du toxique par le sol, la composition de ce dernier jouant au reste un rôle important.

##### b) Le cas des bactéries

Plusieurs publications américaines ont fait état d'une certaine synergie entre désinfectants et mouillants anioniques; ce phénomène qui ne se produit toutefois qu'avec les bactéries Gram + a donné lieu à toute une éclosion d'hypothèses touchant aux phénomènes dits de « surface ». Un de nos collaborateurs, Berthet, a étudié très attentivement l'influence du dioctylsulfosuccinate sur une série d'antiseptiques appliqués au staphylocoque. L'exaltation obtenue est très nette, le coefficient phénol des divers antiseptiques, mesuré par la méthode F. D. A., ayant parfois quadruplé, en présence de ce mouillant. Il convient cependant de ne pas oublier que ces expériences sont réalisées au p<sub>H</sub> 6, et que le staphylocoque se révèle très fragile à toute influence chimique en milieu même très légèrement acide.

Il ne semble pas au reste que cette synergie, limitée à certains cas, ait reçu des applications pratiques dont l'intérêt serait évident.

Notons un autre fait, moins connu, observé par Berthet: on sait qu'en présence de protides (à fonction SH libre ou cachée) le pouvoir antiseptique des dérivés mercuriels est notablement abaissé; or si l'on ajoute à de la

<sup>1</sup> nom commercial: Aerosol OT.

<sup>2</sup> nom commercial: Duponol C.

<sup>3</sup> nom commercial: Santomerse.



gélatine, par exemple, une faible quantité de dioctylsulfosuccinate de Na, ce mouillant s'oppose à l'action inhibitrice de la gélatine, et améliore en conséquence le pouvoir antiseptique du mercuriel. Une adsorption entre l'albumine du sérum et le dodécylsulfate de sodium par ailleurs est citée par la littérature américaine; ce phénomène peut donc s'appliquer au cas de la gélatine, explication des plus simples, comme il pourrait dans une certaine mesure permettre d'interpréter l'action antimicrobienne du mouillant anionique seul.

Ajoutons que toutes nos tentatives de réaliser une synergie entre le mouillant et l'antiseptique se sont révélées infructueuses vis-à-vis d'*Escherichia Coli*.

#### c) Le cas des champignons

L'association d'un mouillant anionique de choix à un fongicide a révélé l'action synergétique la plus accusée, au cours de nos recherches. Il n'est pas chose aisée de résumer en quelques lignes les résultats de très nombreux essais, étant donné la diversité des conditions expérimentales. Retenons les faits suivants comme les plus caractéristiques; la nature du mouillant est importante: pour qu'une synergie se produise, il est nécessaire que le mouillant seul exerce une certaine action toxique sur le champignon. Ainsi, le cétylsulfate comme le cétylphosphate de Na se montrent inopérants, le laurylsulfate, en revanche, le plus actif des mouillants étudiés.

Le toxique lui-même joue un rôle secondaire; nous sommes parvenu à exalter l'action toxique de tous les antiseptiques mis en œuvre; toutefois, l'action maximum a été obtenue avec le sulfate d'oxyquinoléine ainsi qu'avec les dérivés chlorés et hydroxylés du diphénylméthane (G 4 et G 11). Plus l'antiseptique est toxique, semble-t-il, moins la synergie est appréciable.

Enfin, l'espèce fongique elle-même, influe sur le taux de synergie. *Botrytis cinerea* dénote une sensibilité moins marquée qu'*Aspergillus niger*. Parmi les champignons pathogènes, *Mucor pusillus* résiste mieux à cette action combinée que *Achorion Quinckeanum*.

Fait intéressant: l'exaltation de la toxicité des fongicides étudiés par l'adjonction du laurylsulfate de Na se produit en milieu liquide comme en milieu solide; elle affecte la germination sporique comme le mycelium isolé. En revanche, si la synergie est souvent extraordinairement marquée dans l'action fongistatique, dans nos essais in vitro, elle est faible au point de vue fongicide.

Ce qui ressort avant tout de nos expériences peut être énoncé comme suit: il y a effet fongistatique par association d'un antiseptique et d'un mouillant utilisés à des concentrations bien inférieures à la limite de toxicité de chacun des deux pris séparément. Contentons-nous de citer un exemple, avec *Achorion Quinckeanum*:

Dose fongistatique limite du laurylsulfate de Na seul: 1/30 mille

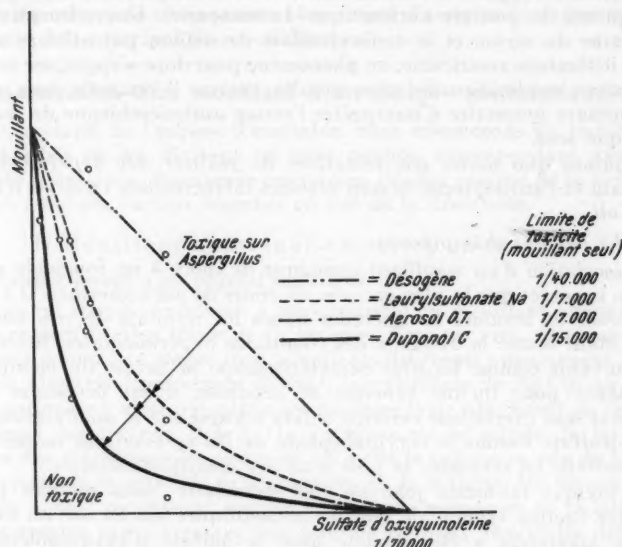
Dose fongistatique limite du G 4 seul: 1/50 mille

La synergie se manifeste pour G 4: 1/700 mille

+ mouillant: 1/200 mille

Autre fait significatif: si l'on fait agir non pas simultanément, mais successivement le mouillant et l'antiseptique sur une suspension de spores, aucune exaltation toxique ne se produit, dans l'action de ce dernier. Le mouillant ne « prépare » nullement la voie au toxique, l'action doit être simulée.

Le graphique ci-dessous donne une expression mathématique claire du phénomène.



En abscisse, on porte la concentration du toxique, et en ordonnée, celle du mouillant. Les courbes sont « isotoxiques », pour plusieurs mouillants associés chacun pour soi au sulfate d'oxyquinoléine.

La flèche bissectrice exprime la synergie de chaque type d'association, par la distance qui sépare la droite (Désogène, d'exaltation nulle) de la branche d'hyperbole équilatère isotoxique.

On voit ainsi que le Désogène (mouillant cationique) ajoute son action toxique à celle du sulfate d'oxyquinoléine, sans synergie réelle, alors que le Duponol C (qui n'est autre que du laurylsulfate de Na pur, l'autre produit désigné sous ce nom étant un mélange) exerce la synergie maximum. Autrement dit, pour le Duponol C il suffira d'en ajouter une très petite proportion à une quantité de sulfate d'oxyquinoléine elle-même très faible, pour obtenir un effet fongistatique.

Il n'est pas sans intérêt de prévoir une application à l'horticulture de l'indifférence de cette association à l'égard des végétaux supérieurs et de cette synergie de toxicité pour les champignons. Dans un travail encore inédit, un de nos collaborateurs, Schmid, après avoir pleinement confirmé ces observations in vitro, a tenté de traiter des plantules de cresson infestées par *Thielavia basicola* et *Pythium de Baryanum*; il a observé très nettement cette synergie pour les deux fongicides cités ci-dessus sans aucun dommage pour la plante. Cependant, seul un effet fongistatique a été atteint, et après 12 jours de traitement; par la cessation de ce dernier, les champignons réapparaissent. Sans être encore concluants, ces premiers essais laissent espérer qu'on pourrait ainsi protéger les plantules plus efficacement pendant la première partie de leur croissance, qui est précisément celle qui est la plus sensible aux attaques parasitaires.

Le mécanisme de cette synergie est d'interprétation difficile, malgré ce que nous savons du rôle joué séparément par la nature de la cellule, la constitution chimique du mouillant et de l'antiseptique, ce dernier facteur semblant le moins important.

Il n'est pas exclu de supposer que certaines cellules végétales (la plupart des champignons, les bactéries Gram +) forment avec le mouillant un « produit d'addition » comparable aux associations observées chimiquement entre certaines albumines et le dodécylsulfate de Na. Le toxique agirait alors plus facilement sur la cellule soit par une dénaturation protidique en quelque sorte déjà amorcée, soit encore en réagissant avec des métabolites essentiels. Le fait que l'action fongistatique exaltée l'emporte de beaucoup sur l'effet fongicide d'une part, et qu'aucune synergie ne se produise en présence des cellules de végétaux supérieurs, nous fait incliner à donner la préférence à la seconde de ces hypothèses, dont la fragilité ne nous échappe aucunement.

Il n'est pas inutile d'ajouter que le genre *Saprolegnia* — exception chez les champignons — se comporte à la façon des bactéries Gram — et des végétaux supérieurs. On sait que la membrane de ces oomycètes se rapproche de celle des végétaux supérieurs, contenant comme ces derniers, de la cellulose et de la callose, ce qui n'est pas le cas des Eumycètes et des autres Phycomycètes. Le parallélisme est frappant, encore qu'il ne nous paraisse pas suffisant pour en tirer une preuve de l'apparentement des saprolégniacées et des végétaux supérieurs.

## II) Mouillants cationiques associés à un toxique

Ces tensio-actifs possèdent une toxicité propre, et qui se manifeste, nous l'avons vu, avec tous les types de cellules végétales considérées.

Ce fait nous a incité à ne pas étudier systématiquement l'association de ces dérivés à des toxiques. Nos expériences, quoique limitées, nous ont permis de constater le plus souvent un effet additif, mais sans synergie bien marquée. Il est important également de ne pas oublier que ce type de mouillant rencontre beaucoup d'incompatibilités chimiques, par association.

## III) Mouillants non ioniques associés à un toxique

Nous avons vu que les tensio-actifs non ioniques, malgré leurs propriétés physiques très voisines de celles des autres mouillants, n'exercent par eux-mêmes aucune action toxique sur la cellule végétale.

On pouvait toutefois se demander quel serait leur comportement une fois associés à un toxique.

Nos expériences, où comme précédemment les variables étaient la nature du mouillant, celle du toxique et la cellule végétale elle-même, ne révèlent aucun cas de synergie: il y a ou indifférence ou au contraire antagonisme, le mouillant diminuant la toxicité de la substance chimique.

Une étude chimique approfondie de cet antagonisme a prouvé que dans certains cas, une réaction se produit entre le mouillant et le toxique, démontrable par un simple dosage analytique. Le phénomène n'est en général pas d'ordre « visuel », mais sa réalité, banale, se passe de commentaires.

Le mouillant non ionique peut être considéré comme détoxiquant, au même titre que toute substance neutralisant chimiquement un poison.

Plus intéressant est le cas, observé en particulier avec le sulfate d'oxyquinoléine, où aucune réaction chimique ne peut être mise en cause. Pour citer un exemple, cet antiseptique est inhibé dans son action fongistatique à l'égard des genres *Penicillium*, *Achorion*, *Aspergillus*, etc. en présence de mouillants du groupe des Tweens. En revanche, *Escherichia Coli* et *S. aureus* ne sont aucunement protégés par les Tweens contre ce même antiseptique, la cellule d'*Elodea* occupant une position intermédiaire.

Une fois de plus, mais pour un phénomène inverse de la synergie, c'est la nature de la cellule végétale qui importe au premier chef.

Il est permis de supposer que l'acide oléique libre contenu dans ce type de mouillant non ionique se combine, comme l'a suggéré Hotchkiss, avec la surface externe de la cellule. Cette combinaison, toute hypothétique, permettrait d'envisager la formation d'une barrière à la pénétration du toxique dans le type de cellule donnant lieu à cette combinaison.

L'acide oléique libre artificiellement ajouté par nous à la place de mouillant, s'est au reste comporté sensiblement à la façon des Tweens.

Stoll et collaborateurs, constatant que le milieu de Dubos (contenant du Tween 80) diminue l'action tuberculostatique des antibiotiques des lichens, semblent admettre implicitement que cette inhibition est causée par l'albumine qui fixerait le tuberculostatique par adsorption. Ne serait-il pas admissible d'envisager le rôle possible du Tween lui-même comme nos expériences l'ont démontré avec des champignons?

Notons au passage que les polyéthylèneglycols ne manifestent pas, dans nos expériences, cet antagonisme; il semble donc que l'on puisse exclure, toujours dans le cadre de nos expériences, un phénomène d'adsorption physique, propriété que l'on a attribuée parfois aux polymères associés à un médicament.

L'altération de la perméabilité de la membrane consécutive à la réaction hypothétique entre l'acide gras et les protéines de la membrane cellulaire peut donc expliquer dans une certaine mesure l'inhibition de l'action toxique par le mouillant non ionique, quand ce dernier, toutefois n'a pas été « capturé » chimiquement par le toxique.

On comprend alors pourquoi le phénomène varie à la fois en fonction de la nature de la cellule végétale et en fonction de son comportement chimique avec le toxique.

Il n'appartient pas à cet exposé de s'étendre sur les conséquences thérapeutiques de ces phénomènes, dans le domaine de l'antiseptique.

En ce qui concerne la cellule végétale et son comportement vis-à-vis de substances toxiques, le présent travail apporte une modeste contribution à certains aspects du problème de la synergie et de l'antagonisme. Il démontre que ces deux phénomènes opposés peuvent être provoqués par des substances très voisines quant à leurs propriétés physiques. Si le rôle de ces propriétés physiques (tension superficielle, pouvoir mouillant), souvent mis en cause, semble être négligeable dans nos expériences, il est évident que les affinités chimiques réciproques entre la membrane cellulaire, le toxique et le mouillant exercent une influence déterminante sur la résistance de la cellule.

Le présent exposé nous autorise à penser que l'emploi généralisé des substances dites « mouillantes » en cytologie non nucléaire contribuerait

à mieux comprendre le comportement des différentes cellules végétales en présence de substances toxiques.

### Résumé

Le présent travail expose quelles sont les réactions de la cellule végétale lorsque cette dernière est soumise à l'association d'un toxique et d'un « mouillant » (Netzmittel).

Les variables sont : la nature de la cellule végétale, celle du toxique et celle du mouillant.

Alors que les mouillants cationiques, eux-mêmes toxiques, exercent une simple action additive, les mouillants anioniques révèlent dans de nombreux cas une synergie de toxicité. Celle-ci se manifeste surtout avec les champignons et les bactéries Gram +, les végétaux supérieurs se montrant indifférents. Cette synergie varie également avec la structure moléculaire du mouillant.

Les mouillants non ioniques peuvent au contraire exercer une action antagoniste, c'est-à-dire diminuer la toxicité.

Ce dernier phénomène se produit dans certains cas à la suite d'une réaction chimique entre le mouillant et le toxique; la nature de la cellule est alors indifférente. Dans d'autres cas, il y a absence de réaction chimique et le phénomène ne se produit qu'avec certains types de cellules (champignons surtout).

La nature chimique du toxique joue, dans la synergie, un rôle moins important que dans l'antagonisme.

Des hypothèses sont formulées pour tenter d'élucider le mécanisme des cas de synergie et d'antagonisme.

### Bibliographie

- Berthet, R., 1949: Étude du pouvoir antiseptique des savons et des mouillants. Thèse doct. Fac. Sc. Univ. Genève, N° 1132 (contient 50 références bibliographiques).
- Bolle, A., et A. Mirimanoff, 1950: Antagonism between non-ionic detergents and antiseptics. J. Pharm. Pharmacol. 2, 685-692.
- 1951: Antagonisme entre mouillants non ioniques et antiseptiques. Pharm. Acta Helv. 26, 284-290.
- Engler, V., 1950: Influence des substances tensio-actives sur la cellule végétale. Thèse doct. Fac. Sc. Univ. Genève, N° 1149.
- et A. Mirimanoff, 1951: Synergie et antagonisme de l'association antiseptique-mouillant au point de vue fongistatique. Pharm. Acta Helv. 26, 59-67.
- Kodicek, E., 1949: The effect of unsaturated fatty acids on Gram positive Bacteria. Symposia of the Soc. f. exp. Biol. No. III, Cambridge, 217, 32.
- Mirimanoff, A., 1949: Influence des substances tensio-actives sur la cellule végétale. Bull. Féd. intern. pharm. N° 3.
- Pollock, M. R., 1949: The effects of long-chain fatty acids on the growth of *Haemophilus pertussis* and other organisms. Symposia of the Soc. f. exp. Biol. No. III, Cambridge, 193-213.
- Schmid, J., 1952: Influence des substances tensio-actives sur le comportement de quelques fongicides. Application à l'horticulture. Thèse doct. Fac. Sc. Univ. Genève (sous presse).



- Stoll, A., A. Brack et J. Renz, 1950: Einfluß von Tween 80-Albumin (Dubos-Nährmedium) auf die wachstumshemmende Wirkung von Flechtenstoffen gegenüber Tuberkelbakterien. Schw. Zeitschr. f. allg. Pathol. und Bakter. XIII, 753-755.
- Trim, A. R., et A. E. Alexander, 1949: Surface activity and permeability as Factors in Drug action. Symposia of the Soc. f. exp. Biol. No. III, Cambridge, 111-142.

## The Cytology of Leaf Homogenates

By

T. E. Weier

University of California, College of Agriculture, Botany Division, Davis,  
California, U.S.A.

(Received October 20, 1952)

### I. Introduction

Biochemistry may perhaps be conveniently divided in two categories. The first of these is concerned with the separation of various materials, proteins, pigments, enzymes, and the like from organs and the delination of the properties and activities of these materials in test tubes. This aspect of biochemistry is a primary field, it is an end in itself, and is a prerequisite to the understanding of the functioning of these materials within the living cell. The second category of biochemistry is concerned with the exact localization of materials within the living cell. In this field the cytologist can well join hands with the biochemist to the mutual advantage of both. Demonstration of the success of such collaboration is afforded by the recent great increase of knowledge of activity of the nucleus that has come from the study of that body by biochemist, cytologist, and geneticist. In the general field of photosynthesis biochemical knowledge is greatly in advance of cytological knowledge. While certain aspects of chloroplast structure are well known, there is, at present, no detailed cytological picture of the leaf as a whole. The mesophyll cells are certainly as important to the life of the plant, and even to our own lives, as the red blood cells and liver cells are to animals, yet they are in comparison to these latter cells quite unstudied. In view of the recent interest in leaf cell particulates it is important to consider the cytology of the mesophyll cell, to indicate certain details which could result in confusion in biochemical research on leaves, and to suggest cytological problems which appear worthwhile.

### II. Leaf Structure

Epidermal cells of leaves have received the most attention. Since, however, they do not function, at least as far as we know, in any photosynthetic reaction we shall not consider them here. Sieve tubes have been extensively studied (Esau 1950, Crafts 1953) in stems and roots, but hardly touched upon in leaves. This work has been largely concerned

with cell wall deposition, with permeability of the protoplast and with increased basiphilia under pathological conditions. An adequate study of protoplasmic details in sieve tubes or accompanying companion cells is lacking. Since one cannot safely assume that these cells lack active and specific enzyme systems they must eventually be considered in studies on the intracellular localization of enzymes. It may also be assumed that leaf sieve tubes have a structure identical with those of stem and root, but we cannot safely assume that they do not contain some specific substance or enzyme system necessary for the proper functioning of leaves. They are most certainly highly specialized cells.

Xylem elements such as vessels and tracheids are dead or relatively inactive. Fibers, generally, contain a small number of chloroplasts (Moissejewa 1943). So little cytological detail is known about these specialized cells particularly in leaves, that it is at present unprofitable to consider them. Surrounding most veins is a layer of parenchyma cells, the border parenchyma or bundle sheath. This is a specialized tissue containing (1) chloroplasts, often recognizably different from those of the mesophyll cells, and (2) in some species relatively large amounts of tannin. Tannin may also occur in considerable amounts in mesophyll cells. The coagulating effect that it would have on the hyaloplasm during homogenization makes it important, since a coagulation of the hyaloplasm would be expected to influence its distribution during centrifugation.

Most prominent in mesophyll cells are the chloroplasts which may completely fill the cell, obscuring other details. Nuclei are present; in living cells they are as large or larger than the chloroplasts, during fixation and staining they frequently undergo considerable shrinkage so that in permanent preparations they may appear quite small. We have assumed for them a structure similar to that found in the nuclei of meristematic cells. The status of mitochondria is confusing so they are purposely omitted from the category of permanent organelles of leaf cells. The hyaloplasm has been generally neglected, although it is the medium in which the cooperating nuclei, plastids and mitochondria (if present) are suspended. It must have some function and it cannot be ignored simply because it is a material that is difficult to demonstrate.

Nuclei, mitochondria, and chloroplasts must now be considered in some detail.

### III. Nuclei

At present there is no detailed account of the structure of the nuclei of mesophyll cells. It seems safe to assume, however, that they are typical, possessing a membrane with nucleoli and a reticulum embedded in a karyolymph. In some living cells they appear granular. After osmic acid fixation and Feulgen staining they may be small and an intense uniform red or they may be larger and possessing a real granular or reticular internal structure.

Mirsky and Ris (1947), using the Waring Blendor and centrifuge, report the isolation of chromosomes from the nuclei of liver cells. Lamb

(1950), in repeating the experiment, believed that the Feulgen positive strands in the homogenate were not chromosomes but drawn out nuclei. Smears of leaf homogenates prepared by grinding either in the Waring Blendor or with sand in 0.5M sucrose may also be stained by Feulgen's technique. After Waring Blendor grinding Feulgen positive structures which may be interpreted either as drawn out nuclei or as chromosomes thrown out with the chloroplasts in a 60 g pellet (Weier and Stocking 1952). These Feulgen positive structures remain with the chloroplasts in a subsequent pellet obtained at 600 g and were still associated after two washings. Waring Blendor grinding may thus result in nuclear contamination, which is likely to be more serious if the nuclei are disrupted allowing the chromosomes to unravel, for in this event, nucleoli and karyolymph must be released to the medium. If Caspersson's (1950) theory of protein synthesis by the nucleoli be correct, then such a contamination, if disregarded, might lead to errors in the localization of enzyme systems within the cell. The isolated nuclei, after sand grinding, showed much less disorganization than after Waring Blendor grinding. The great majority were spherical and quite normal in appearance, only occasional Feulgen positive strands were observed. Furthermore, they were more easily separated from the chloroplasts, two washings of a 200 g centrifugate yielding a pellet almost free of nuclei.

Nuclei and nuclear derivatives may be detected in a freshly prepared pellet by simply mounting a small amount of material with methyl green on a slide and observing with the microscope. Methyl green is quite specific for DNA (Kurnick 1950) staining whole or broken nuclei a bluish green which is easily differentiated from the deeper more brilliant green of the chloroplasts. The preparation of permanent slides is simple, a half hour in a 1% solution of toluidine blue, after fixation in osmium fumes, yields a preparation in which nuclei, nuclear derivatives, disorganized chloroplasts and granules of an unknown nature are intensely blue, while visually normal chloroplasts are a delicate green.

The nucleus may be so easily identified cytologically that any visible contamination of chloroplast suspension by nuclei or their derivatives should not pass unrecognized. There still remains the possibility, however, of diffusion from the nucleus upon the death of the cell and during grinding and centrifuging of certain, as yet unknown, substances. This involves the general question of the permeability of intracellular bodies and is discussed briefly in relation to chloroplasts.

#### IV. Mitochondria

The presence of mitochondria in animal cells is well established and recent work is beautifully demonstrating the association with them of certain enzyme systems (Green 1951): Harmon (1950a and b) and Harmon and Feigelson (1952a and b) have recently pointed out that not only is their shape related to their function but also that there is a very direct interrelationship between the mitochondrial population of

a cell and the rate of activity of the cell. In plant cells, also, a relationship between mitochondrial numbers and rate of activity and function has been noted (Bauer 1943). Mitochondria are generally present in large numbers in meristematic cells (Guilliermond 1941) or cells such as the scutellum (O'Brien 1951) of grains that have a definite digestive function; they are present in epidermal cells of leaves (Sorokin 1941) which are likely to be actively secreting cutin. They have not been adequately studied in the mesophyll cells of leaves. Granules in leaf cells of some species were described as long ago as 1890 by Zimmermann and their presence confirmed in 1908 by Vouk. Löwtschin published a report in 1914, shortly after the term mitochondria was applied to such granula, the only extant study whose main objective was the mitochondria in mature leaf cells. He found mitochondria in the mesophyll cells of *Elodea canadensis* and *Populus tremula* while they were absent from such cells of *Selaginella martensii* and *Corylus avellana*. Normal illuminated mesophyll cells of *Quercus pedunculata* do not contain mitochondria, but after 14 days in darkness a few well formed granules were to be found in most cells. Cells of *Corylus* did not respond in a similar manner to darkness; mitochondria were not observed in these cells even after 14 days in the dark. On the other hand there appeared to be a diminution in the mitochondrial content of the leaves of *Populus tremula* when this plant was kept in the dark. Consequently Löwtschin concluded that there was no direct relationship between the mitochondrial content of mesophyll cells and photosynthesis. Löwtschin's observations are supported by adequate photomicrographs.

Most workers agree that meristematic cells generally contain more granules than there are chloroplasts in the resulting differentiated mesophyll cells. Kassman (1926) estimates the ratio is about 2 to 1. There is further a general assumption that the excess granules which do not develop into chloroplasts remain as mitochondria in the mature cells of the leaf. Unfortunately there has been no adequate analysis of shoot tip development that rigorously establishes this point. For instance, Zirkle (1929) definitely states in introductory remarks to a report on chloroplast development in *Zea mays* that not all of the mitochondria in the cells of the apical meristem develop into chloroplasts. Yet his detailed description, which is documented by photomicrographs, states that the cells of leaf primordia which develop into mesophyll cells contain only proplastids. Mitochondria of sieve tube elements are derived from these proplastids, while mature chlorenchyma cells contain only chloroplasts.

Randolph (1922) found only proplastids in the apical cells of corn shoots all of which developed into chloroplast. Kassman (1926), as already stated, was of the opinion that only about 50% of the granules present in the apical meristem cells could develop into chloroplasts. She agreed, however, with Randolph and Zirkle in finding only chloroplasts in mature leaf cells. The absence of mitochondria from these cells is accounted for by their dissolution in the hyaloplasm during development. It is perhaps unfortunate that students of shoot differentiation have

so completely neglected the protoplast, for after all cell wall differentiation must be closely associated, either as a result or possibly as a cause, with protoplasmic differentiation.

It has not been possible to demonstrate cytologically whether or not the meristematic cells of shoot apices contain only mitochondria, or mitochondria and proplastids (Newcomer 1951, Weier and Stocking 1952).

The enzyme systems of the Krebs cycle and photosynthesis may or may not be closely associated. The actual demonstration of these enzyme systems in, or their potential development from, one or two, or more categories of granules is a problem of the highest theoretical importance. Mitochondria in certain animal cells, probably in all, contain the cyclophorase system of enzymes. The synthesis of starch and of chlorophyll indicates that chloroplasts contain precise enzyme teams analogous to the cyclophorase team but with very different energy relationships. Proplastids do not contain the set of enzymes responsible for starch synthesis; they probably do contain enzymes which are the precursors of the "photosynthesis team." These enzymes have greatly different energy relationships than cyclophorase. If but a single category of particle be present in meristematic cells of plants it must contain the cyclophorase system of enzymes plus the precursor systems for chlorophyll and carbohydrate synthesis. In the possession of these latter systems the plant cell particulate would differ from animal mitochondria which never develop the ability to photosynthesis. If two distinct categories of particulate elements are present in plant meristems, mitochondria and proplastids, then these respective enzyme systems should be also distinct and possibly capable of separation. These cytological hypothesis regarding the relationships of proplastids and mitochondria in plant meristems is reflected directly in the views of Calvin and his collaborators (1951) and of Gaffron and Fager (1951) as to the course of photosynthesis. The biochemist should bear in mind that small granule fractions could be mixtures of several types of granules with very different functions.

In a cytological study of the development of variegated leaves of boxelder von Loui (1950) noted a variation in the form and size of mitochondria in regions of varying chloroplast development. His analysis of mitochondrial development in normal green leaves is, however, not detailed. He simply states that the mesophyll cells of such leaves are strikingly lacking in mitochondria, and yet are packed with chloroplasts. Woods and duBuy (1943), while reporting the isolation of mitochondria from the mesophyll cells of tobacco leaves, do not illustrate a single such element in either their drawings or their photomicrographs.

The most extensive study of mitochondria in mesophyll cells was made by Heitz (1936) as purely incidental observations accompanying his detailed study of chloroplast structure. As such it quite naturally leaves some important questions unanswered. Heitz examined the living mesophyll cells of 180 plants. His criterion of normal healthy cells was cyclosis, normal appearing mitochondria and distinct nuclei. He further was



interested in granular chloroplasts. These requirements are such as to possibly restrict his observations to cells of a similar physiological state. Not all of the 180 plants provided satisfactory material for his observations. A good many were, however, excellent. These he describes and illustrates, largely by photomicrographs. But even in the best material it was necessary to search for cells that met all of his requirements. He states that plants in which mitochondria were distinct were to be so marked in his accompanying tables; yet no such plants occur in the tables. In some photomicrographs mitochondria are distinct, in others showing equal chloroplast detail, no mitochondria are to be seen. The general conclusion which one must draw from Heitz's paper is that mitochondria are a variable cytoplasmic constituent of mesophyll cells.

Mitochondria in leaf cells are apparently delicate structures easily modified by slight (Beauverie 1921) injury to the tissue. This may account for their apparent absence from cells used for microscopic examination. If this be true, what then must be the state of the mitochondria isolated from mesophyll cells in sugar solution?

The specific density of mitochondria, should they be present in leaf cells, has also been rather generally assumed to be low. Beams and King (1939) and Jones (1938) have investigated, in a rather superficial manner, the relative density of the cellular bodies of mesophyll cells. Jones' results are confused by osmiophilic platelets, pseudo-chondriomes, and such structures. But both Jones and Beams and King are in general agreement that the chloroplasts are heavier than other smaller granules, but not greatly so. In our own laboratory we have frequently had a granular material of approximately mitochondrial size and shape thrown down at 600 g and thus associated with chloroplasts. A distinct association of the granular material obtained by high centrifugal speeds with intracellular granules of the mesophyll leaf must preclude any assured localization of enzymes within intracellular granules.

The conclusion regarding the nature of mitochondria of mesophyll cells, drawn from the accounts of the existing literature, must be that they are highly variable intracellular components. Whether or not this conclusion will withstand thorough examination remains to be seen. If it is substantiated the conditions influencing their variation must be accurately determined. Furthermore, there are no observations which adequately link mitochondria of leaf cells with mitochondria of leaf homogenates. While the assumption that the two are identical is perhaps permissible, general conclusions based upon such an assumption had best be drawn with caution.

## V. Chloroplasts

Hill's (1939) initial discovery of oxygen evolution by isolated chloroplasts has done much to stimulate the present interest in leaf homogenates. Furthermore, Hill and his collaborators (1951) together with French and Milner (1951) appear to have, at least to the morphologist, an exceedingly healthy appreciation of the problems involved in determining the local-

ization of enzymes within the chloroplast. A knowledge of living structure as well as those changes which take place during isolation are important to an understanding of intracellular and intraplastid activity.

The chloroplast in the living leaf cell has a variable appearance. In its simplest aspect it is a homogenous, green body. It may or may not contain starch which, when present, may be solid granules or liquid droplets (Weier, unpublished). More frequently the chloroplast is a composite structure consisting of plate-like grana which contain the chlorophyll embedded in a colorless stroma (Meyer 1883, Heitz 1936). This granular appearance is enhanced by low illumination of the leaves for some time previous to study (Weier 1938) and injury (Granick and Porter 1947). The grana sometimes appear to be connected by strands (de Rezende-Pinto 1948) or oriented in distinct planes parallel with the long axis of the plastid (Heitz 1936), phenomena which account for a striated appearance (Menke and Koydl 1939, Küster 1937). Vacuoles have also been described within the chloroplast (Zirkle 1926, Schmidt 1951, Küster 1937). These changes appear to be reversible and have been studied to some extent (Schmidt 1951).

Paraffin sections of mature leaves (Weier, unpublished) after a variety of fixatives and stains yield essentially similar views of chloroplast structure. The stroma, in the majority of cases, has a greater affinity for stain than the grana. These latter bodies, however, reduce osmium tetroxide to black metallic osmium (Weier 1936, and further unpublished observations) and appear as brilliant points of light in dark field. After toluidine blue staining those chloroplasts having a normal grana-stroma structure are a delicate green (Weier and Stocking 1952). In smears from leaf homogenates the great majority of chloroplasts have a grana-stroma structure. This granular appearance was long thought to be a pathological state (Liebaldt 1913, Menke 1933) and Granick and Porter (1947) have remarked at its greater prominence in isolated chloroplasts. Such chloroplasts stain a delicate green in toluidine blue and it appears safe to assume that although these isolated chloroplasts cannot have a structure identical with that of the living state they do approach the living condition, in at least coarse details.

Pathological changes in chloroplasts have received considerable attention from European workers (Küster 1937), and careful study of the chloroplasts in experimental leaves and in homogenates should be made with these investigations in mind. So far only two definite pathological changes have been encountered in leaf homogenates in our laboratory, a third must occur although it has not been identified on the slides.

Chloroplasts sometimes swell to form a large clear sphere to the exterior of which the irregular grana-stroma mass is attached. This occurs in living plastids and may be brought about in hypertonic solutions both in chloroplasts in intact cells and in isolated chloroplasts. In paraffin sections such disorganized chloroplasts are strongly basiphilic and stain a deep blue in toluidine blue. In smears of leaf homogenates similarly swollen chloroplasts stain an intense blue. In slides of leaf homogenates the chloro-

plast loose their identity, margins fusing irregularly so that a moderately uniform granular chloroplast mass appears under the microscope. This change seems to occur on the slide during processing, but if a similar change should occur in the homogenate it could greatly influence the experimental results. During grinding and centrifuging much starch may be torn from the chloroplast. This should leave torn or injured plastids in the pellet, but so far no chloroplasts injured in this way have been identified. Obviously if starch is thus torn from the chloroplasts other materials could also leave it. Küster (1937) describes numerous other types of injury, but as they have not yet been encountered in leaf homogenates it is not profitable to discuss them here.

When cells are killed rapid changes appear to take place at the moment of death. For instance chloroplasts killed by acidified silver nitrate rapidly reduce the nitrate to metallic silver. This does not happen generally when the silver nitrate is applied to cells killed in a manner which allows rapid oxidations to take place within the leaf (Molisch 1918, Weier 1938, Pekarek 1938). Sections of leaves placed in the silver nitrate solution usually darken along their margin. In leaves killed in the absence of oxygen silver nitrate may continue to be reduced by the chloroplasts even though they are dead. It appears that upon death a rapid oxidation of some chloroplastic material must occur. It is of interest that Stocking (1952) found the synthesis of starch from glucose 1-phosphate to occur along margins of leaf sections or even along an incision made in the epidermis with a razor. In their studies on haematin pigments in chloroplasts Hill and Scoresbrick (1952) also came to the conclusion that rapid and fundamental changes occurred in the chloroplast at the instant of death.

It would appear from this that changes in the permeability of the chloroplast probably occur at death. For instance, the synthesis of starch from sucrose in sections of bean leaves kept in the dark occurs within the chloroplast. Similar treatment of leaf sections floated in glucose 1-phosphate results in the synthesis of starch in the hyaloplasm. This should, of course, not occur if biochemical theory, which suppose the synthesis of starch from glucose 1-phosphate within the chloroplast is correct; either it is incorrect or permeability relationships are so modified by the conditions of the experiment that the normal course of events is disturbed.

Initial studies on chloroplast permeability have been carried out (Schmidt 1951). It has been established, for instance, that the chloroplasts in certain aquatic plants, such as *Helodea densa*, submerged in dilute solutions of various alkaloids and illuminated will form large vacuoles. in physostigmin (1:2,000) and nicotine (1:2,000) the chloroplasts swelled to more than twice their normal diameter (Schmidt 1951). The change is reversible and, with physostigmin, may be repeated from 4 to 6 times, if the sprigs are kept in tap water in darkness, from 1 to 2 days between experiments. Schmidt (1951) was able to show that the vacuole formation was due to an accumulation of glucose, and followed its increase in concentration during the development of the vacuole. The sugar concentration at the start of an experiment is 0.4 M. After three hours of illumination

in the alkaloid it increases to 1.2 M. The chloroplasts, initially showing a normal grana-stroma, become, at first, more prominently granular. The granules then broke up and disappeared; they were replaced by striations. After about 60 minutes illumination a vacuole appears and enlarges very rapidly. At the appearance of the vacuole the sugar concentration was about 1 M. It increased to 1.2 M as the vacuole itself enlarged to about twice the size of the normal chloroplast. In addition to being reversible there appeared to be little change in oxygen evolution during an experiment.

It is not easy to evaluate these experiments. The action of alkaloids on the living protoplast is complex. They do not, however, destroy the cell as does isolation of the chloroplast. The accumulation of sugars and resultant vacuolization of the chloroplast must be associated with diffusion processes and involve the permeability of the chloroplasts to alkaloids, to sugars, and probably to other material. The experiments are positive in that they seem to indicate the presence of differentially permeable membranes associated with the chloroplast and the problem of chloroplast permeability is amenable to experimentation.

Efforts in our laboratory to isolate grana from the stroma have so far been unsuccessful. French and Milner's (1951) statement that no evidence exists for the isolation of stroma-free grana is very sound. And when grana are isolated they will need to be very accurately differentiated from any mitochondria that may be present. It is difficult to evaluate Calvin and Lynch's (1952) reported isolation of grana-like bodies from blue green algae by supersonics and sand grinding. These workers, searching for a source of grana uncontaminated by stroma, selected the blue green algae *Synechococcus cedorum*. Since chloroplasts as such are absent from the blue greens it is quite possible that chlorophyll is present in small cytoplasmic particles suspended in the hyaloplasm. These results are of great interest and need cytological study. However, until such cytological verification is obtained it might be preferable to follow Claude's (1946) early procedure of referring to "large particle fractions" and "microsome fractions" rather than to definitely identify particles in homogenates with those in leaf cells. The designation "grana-like" used by Calvin and Lynch is quite acceptable but it should not automatically become "grana" without verification. It should also be pointed out that photosynthesis within the leaf cell must utilize not only the grana, but also the stroma and very probably the hyaloplasm.

As a matter of fact there is as yet no rigorous demonstration showing that isolated chloroplasts are completely free of hyaloplasm. The question at present may be somewhat academic although under certain conditions the presence of a layer of hyaloplasm could modify conclusions.

## VI. Conclusion

For the cell physiologist interested in the structure of the mesophyll cell and the functions of its various parts the immediate problems may be listed as follows:

First, pure suspensions of chloroplasts, nuclei, mitochondria and hyaloplasm must be obtained. Prerequisite to the obtaining of such pure suspensions are adequate means of identifying structures occurring in both leaf cell and in leaf homogenate. Such a study may well lead a revolution of the cytologists conception of the mesophyll cell.

Secondly, it is not sufficient to obtain pure fractions of chloroplasts, nuclei, mitochondria and hyaloplasm. These materials must be obtained with as little change from their living state as possible and such changes as occur must be carefully evaluated and interpolated in the final conclusions.

#### Literature

- Bauer, Leopold, 1945: Untersuchungen zur Entwicklungsgeschichte und Physiologie der Plastiden von Laubmoosen. *Flora*, N. F. 36, 30-84.
- Beams, H. W., and R. L. King, 1939: The effect of centrifugation on plant cells. *Bot. Rev.* 5, 132-154.
- Beauverie, J., 1921: La resistance plastidaire et mitochondriale et le parasitisme. *Compt. Rend. Acad. Sci.* 172, 1195-1198.
- Calvin, M., J. A. Bassham, A. A. Benson, V. H. Lynch, C. Ouellet, L. Schou, W. Stepka, and N. E. Tolbert, 1951: Carbon dioxide assimilation in plants. S.E.B. Symposion. Vol. 5. Photosynthesis.
- and V. Lynch, 1952: Grana-like structures of *Synechococcus cedorum*. *Nature* 169, 455-456.
- Caspersson, T. O., 1950: Cell growth and cell function. Norton, New York, 1-185.
- Claude, A., 1946: Fractionation of mammalian liver cells by differential centrifugation. II. Experimental procedures and results. *Jour. Exp. Med.* 84, 61-89.
- Crafts, A. S., 1933: Sieve-tube structure and translocation in the potato. *Plant Physiol.* 7, 183-225.
- Esau, K., 1950: Development and structure of phloem tissue. II. *Bot. Rev.* 16, 67-114.
- French, C. S., and H. W. Milner, 1951: The photochemical reduction process in photosynthesis. *Carbon Dioxide Fixation and Photosynthesis*, New York.
- Gaffron, H., and E. W. Fager, 1951: The kinetics and chemistry of photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 2, 87-114.
- Granick, S., and K. R. Porter, 1947: The structure of the spinach chloroplast as interpreted with the electron microscope. *Amer. Jour. Bot.* 34, 545-550.
- Green, D. E., 1951: The cyclophorase system. *Enzymes and enzyme systems*. Edited by John T. Edsall. 15-46. Harvard Univ. Press.
- Guilliermond, A., 1941: The cytoplasm of the plant cell. 245 p. *Chronica Botanica*.
- Harmon, J. W., 1950 a: Studies on mitochondria. I. *Exp. Cell Res.* 1, 382-393.
- 1950 b: Studies on mitochondria. II. The structure of mitochondria in relation to enzymatic activity. *Exp. Cell Res.* 1, 394-402.
- and M. Feigelson, 1952 a: Studies on mitochondria. III. The relationship of structure and function of mitochondria from heart muscle. *Exp. Cell Res.* 3, 47-58.
- 1952 b: Studies on mitochondria. IV. The cytological localization of mitochondria in heart muscle. *Exp. Cell Res.* 3, 58-64.
- Heitz, E., 1936: Untersuchungen über den Bau der Plastiden. I. Die gerichteten Chlorophyllscheiben der Chloroplasten. *Planta* 26, 134-163.



- Hill, R., 1937: Oxygen evolution by isolated chloroplasts. *Nature* 139, 881-882.
- 1939: Oxygen produced by isolated chloroplasts. *Proc. Roy. Soc. B.* 127, 192-210.
- and R. Scoresbrick, 1951: The haematin compounds of leaves. *The New Phytologist* 50, 98-111.
- Jones, R., 1938: The nature and relative specific gravities of the inclusions in ultracentrifuged cells of *Elodea* and *Triticum*. *La Cellule* 47, 61-76.
- Kassman, T., 1926: Die Entwicklung der Chondriosome und Chloroplasten von *Cabomba aquatica* und *Cabomba caroliniana* von Dauerbeobachtungen an lebenden Zellen. *Planta* 1, 624-656.
- Kurnick, N. B., 1950: The quantitative estimation of desoxyribosenucleic acid based on methyl green staining. *Exp. Cell Res.* 1, 151-158.
- Küster, E., 1937: Pathologie der Plastiden. *Protoplasma-Monographie* 13, II.
- Lamb, W. G. P., 1950: The isolation of threads from interphase nuclei. *Exp. Cell Res.* 1, 571-581.
- Lieballdt, E., 1913: Über die Wirkung wässriger Lösungen oberflächenaktiver Substanz auf die Chlorophyllkörner. *Z. Bot.* 5, 65-115.
- Loui, J. von, 1951: Fluoreszenzmikroskopische und zytologische Untersuchungen über die Frage der Individualität der Plastiden. *Planta* 12, 191-238.
- Löwtschin, A. M., 1914: Vergleichende experimental-cytologische Untersuchungen über Mitochondrien in Blättern der höheren Pflanzen. *Ber. d. Deutschen Botan. Gesellsch.* 32, 266-270.
- Menke, W., 1933: Chloroplasten-Studien. *Protoplasma* 21, 279-298.
- and E. Koydl, 1939: Direkter Nachweis des lamellaren Feinbaues der Chloroplasten. *Naturwissenschaften* 27, 29-30.
- Meyer, A., 1883: Das Chlorophyllkorn in chemischer, morphologischer und biologischer Beziehung. Leipzig, 1-91.
- Mirsky, A. E., and Hans Ris, 1947: Isolated chromosomes. *Jour. Gen. Physiol.* 31, 1-6.
- Moissejew, M., 1943: Über die Chloroplasten im Gefäßbündel des Hypokotyls und im Stengel bei Curcubitaceen. *Ber. d. Deutschen Botan. Gesellsch.* 61, 153-157.
- Molisch, H., 1918: Das Chlorophyllkorn als Reduktionsorgan. *Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien, math.-naturw. Kl., Abt. I.* 127, 449.
- Newcomer, E. H., 1951: Mitochondria in plants. II. *The Bot. Rev.* 17, 53-89.
- O'Brien, J. A., Jr., 1951: Plastid development in the scutellum of *Triticum aestivum* and *Secale cereale*. *Amer. Jour. Bot.* 38, 684-696.
- Pekarek, J., 1938: Über eine besondere Form der Silbernitratreduktion der Chloroplasten. *Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien, math.-naturw. Kl.* 15.
- Randolph, F., 1922: Cytology of chlorophyll types of maize. *Bot. Gaz.* 73, 337-375.
- de Rezende-Pinto, 1948: Sur la structure hélicoïdale des chloroplasts. *Portugaliae Acta Biologica* 2, 111-114.
- Schmidt, H. H., 1951 a: Studien zur experimentellen Pathologie der Chloroplasten. I. Untersuchungen über die Vakuolenbildung der Chloroplasten durch Alkaloide und Anästhetika. *Protoplasma* 40, 209-237.
- 1951 b: Studien zur experimentellen Pathologie der Chloroplasten. II. Untersuchungen über die Streifen- und Näpfchenbildung der Chloroplasten. *Protoplasma* 40, 507-526.
- Sorokin, H., 1941: The distinction between mitochondria and plastids in living epidermal cells. *Amer. Jour. Bot.* 28, 476-485.
- Stocking, C. R., 1952: The intracellular location of phosphorylase in leaves. *Amer. Jour. Bot.* 39, 283-287.

- Taft, E. B., 1951: The specificity of the methyl green-pyronin stain for nucleic acids. *Exp. Cell Res.* 2, 312-326.
- Vouk, V., 1908: Laubfarbe und Chloroplastenbildung bei immergrünen Holzgewächsen. *Sitzungsber. k. Akad. Wiss. Wien, math.-naturw. Kl.* 117, 1337-1378.
- Weier, T. E., 1936: The structure of the chloroplast of *Pellionia pulchra*. *Cytology* 7, 504-509.
- 1938 a: Factors affecting the reduction of silver nitrate by chloroplasts. *Amer. Jour. Bot.* 25, 501-507.
- 1938 b: The viability of cells containing granular and optically homogeneous chloroplasts. *Protoplasma* 31, 346-350.
- and C. R. Stocking, 1952 a: The chloroplast: Structure, inheritance, and enzymology. *Bot. Rev.* 18, 14-75.
- 1952 b: A cytological analysis of leaf homogenates. I. Nuclear contamination and disorganized chloroplasts. *Amer. Jour. Bot.* 39.
- Woods, M. W., and H. G. duBuy, 1945: Evidence for the evolution of phytopathogenic viruses from mitochondria and their derivatives. I. Cytological and genetical evidence. *Phytopathology* 33, 637-655.
- Zimmermann, A., 1893: Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Pflanzenzelle, Tübingen.
- Zirkle, C., 1926: The structure of the chloroplast in certain higher plants. *Amer. Jour. Bot.* 13, 301-340.
- 1929: Development of normal and divergent plastid types in *Zea mays*. *Bot. Gaz.* 88, 186-203.

### Referate.

**Bawden, F. C.: Plant Viruses and Virus Diseases.** Third, entirely revised edition. Lex.-8°, XIV und 376 Seiten, 59 Textfiguren, Ganzleinw. The Chronica Botanica Co., Waltham, Mass., 1950. \$ 6.—.

Es mag paradox erscheinen, daß das Problem der Viren, d. h. von submikroskopischen Partikeln, von denen die Wissenschaft noch gar nicht weiß, ob sie lebend sind, heute in der Lebensforschung eine zentrale Stellung einnimmt. Virologen, Phagologen, Mediziner, Phytopathologen, Cytologen, Chemiker, Physiker bemühen sich um die Aufklärung der Rätsel, die sich um „Life's Enemy“, wie K. M. Smith das Virus so treffend nennt, gruppieren. Die Virologie ist eine so vielseitige Wissenschaft, daß die Verständigung der Forscher untereinander gar nicht leicht ist. Und doch sollen, ja müssen die Mediziner von dem wissen, was die Botaniker erarbeitet haben und auch von den Erkenntnissen der Vererbungsforscher, Cytologen, Chemiker auf diesem Gebiete. Es werden daher alle Virologen, von welchen Disziplinen her sie auch auf die Virus-Forschung stoßen, es freudig begrüßen, daß auf einem wichtigen Teilgebiet, nämlich dem der Phytovirologie, der heutige Stand des Wissens in dem Buch von Bawden eine so meisterhafte Darstellung gefunden hat. Der Protoplasmatiker wird sich u. a. ganz besonders für die Kapitel „Internal Symptoms of Infected Plants“, „The Crystallinity of Plant Viruses“, „Speculations of the Origins of Viruses“ interessieren.

F. Weber (Graz).

**Brachet, Jean: Le rôle des ascides nucléiques dans la vie de la cellule et de l'embryon.** Actualités Biochimiques. No. 16. 122 Seiten. Liège et Paris 1952.

Brachet, dem die Zytochemie, die Histochemie sowie die Chemie der Embryoentwicklung durch seine Methode des Nachweises der Ribonukleinsäure sowie durch andere neue Verfahren einen außerordentlichen Fortschritt verdankt, hat in dieser kurzen Schrift einen geradezu spannend zu lesenden Bericht darüber gegeben, wie diese Wissenschaften auf neuen Wegen zu neuen wichtigen Erkenntnissen schreiten. Kapitel I behandelt die Rolle und Lokalisation der Nukleinsäuren in der Zelle, Kapitel II die Verteilung der Thymo- und Ribonukleinsäure im sich entwickelnden Embryo, Kapitel III die Aufgabe von Karyo- und Cytoplasma in der Entwicklung und Differenzierung, Kapitel IV berichtet über die Funktionen von Kern und Cytoplasma im Stoffwechsel einzelliger Organismen. Über 300 Literaturhinweise erleichtern das weitere Eindringen in das Werden dieser rasch wachsenden Wissensgebiete. Keine andere Schrift könnte besser in die Reihe passen, die den Titel „Actualités“ führt, und kaum ein anderer Forscher hätte dieses aktuelle Thema in so fesselnder, faszinierender, vollendeter Form darstellen können.

F. Weber (Graz).

Herausgeber, Eigentümer und Verleger: Springer-Verlag, Wien I, Mölkerbastei 5. — Für den Inhalt verantwortlich: Prof. Dr. Friedl Weber, Graz, Schubertstr. 51, und Prof. Dr. Josef Spek, Rostock, Zoologisches Institut. — Druck: Adolf Holzhausens Nfg., Wien VII, Kandlgasse 19-21







	Seite
Referate.....	272

Bei der Schriftleitung sind folgende weitere Arbeiten eingelangt:

Windisch, F., D. Stierand und H. Haehn: Über den Nachweis der Zellphosphate und die Unspezifität der bisher gebräuchlichen histochemischen Methoden zur Lokalisierung der Ribonukleotide.....	19. 7. 1952
Bancher, E.: <i>Paeonia</i> -Blüte und ihr zellphysiologisches Verhalten während des Abblühens.....	30. 8. 1952
Pfeiffer, H. H.: Doppelbrechung und Orientierungsrate der Leptonen fließenden Protoplasmas.....	20. 10. 1952
Weber, F.: Hypotonie-Resistenz-Unterschiede von Blütenblättern.....	2. 11. 1952
Höfler, K., und H. Schindler: Vitalfärbbarkeit verschiedener Closterien...	12. 11. 1952
Diannelidis, Th., und K. Umrath: Über das elektrische Potential und über den Erregungsvorgang bei dem Myxomyceten <i>Physarum polycephalum</i> ....	20. 11. 1952
Schittengruber, Brigitte: Das Anthoorphin der Involukralblätter von Kompositen fehlt ihren Schließzellen.....	12. 12. 1952
Wunderly, Ch., und H. Gloor: Versuche zur Charakterisierung der larvalen Blutproteine normaler und letaler Genotypen von <i>Drosophyla</i> mittels Papier-Elektrophorese.....	15. 12. 1952
Höfler, K.: Zur Frage des Plasmalemmas bei <i>Spirogyra</i> .....	19. 12. 1952
Schittengruber, Brigitte: Kontraktion Anthoorphin-haltiger Vakuolen....	22. 12. 1952
Weber, F.: Eiweißpolyeder in <i>Pereskopsis</i> -Virus-trägern.....	24. 12. 1952
Mevius, W., sen. und D. Düvel: Die Grana-Anordnung in Chloroplasten....	2. 2. 1953
Gillissen, G.: Die Fällungsmetachromasie.....	14. 2. 1953
Laber, Ilse: Entwicklung und Nekrose einiger kurzlebiger Pflanzenhaare..	27. 2. 1953
Casari, K.: Über den Plasmolytikumwechsel-Effekt.....	27. 2. 1953
Schittengruber Brigitte: Stomata fehlen den Blatflecken von <i>Maranta leuconera</i> .....	28. 2. 1953
Perner, E. S.: Die Sphärosomen (Mikrosomen) pflanzlicher Zellen.....	6. 3. 1953
Stockinger, L.: Das Kernkörperchen.....	11. 3. 1953
Cohen, M., and E. Bowler: Lamellar Structure of the Tobacco Chloroplast	18. 3. 1953
Härtel, O., und Irmtraud Thaler: Die Proteinoplasten von <i>Helleborus corsicus</i> WILLD.....	21. 3. 1953
Kuhl, W.: Zeitrafferfilm-Untersuchungen über die Wirkung von Zentrifugierung und Pressung auf die Cytoplasmastrukturen, den Plasmogamieablauf und die Zellrestitution bei <i>Actinosphaerium eichhorni</i> EHRBG.....	26. 3. 1953
Wiede, Margot: Über den Einfluß pharmakologischer Reize auf das Zellbild der Streifenstücke.....	10. 4. 1953
Weber, F., und Griseldis Kenda: Rasche Vakuolenkontraktion in <i>Pulmonaria</i> -Blütenzellen.....	11. 4. 1953

## FORTSCHRITTE DER BOTANIK

Unter Zusammenarbeit mit mehreren Fachgenossen  
und der

Deutschen Botanischen Gesellschaft

herausgegeben von

Professor Dr. Ernst Gäumann  
Zürich

Professor Dr. Otto Renner  
München

### Dreizehnter Band

Bericht über die Jahre 1949—1950

Mit 53 Abbildungen. IV, 387 Seiten. 1951. DM 42.—

#### A. Morphologie

1. Morphologie und Entwicklungsgeschichte der Zelle. Von Professor Dr. L. Geitler, Wien. (Mit 3 Abbildungen.)
2. Morphologie einschließlich Anatomie. Von Professor Dr. W. Troll und Professor Dr. H. Weber, Mainz. (Mit 27 Abbildungen.)
3. Entwicklungsgeschichte und Fortpflanzung. Von Professor Dr. O. Jaag, Zürich. (Mit 5 Abbildungen.)
4. Sublichtmikroskopische Morphologie\*). Von Professor Dr. A. Frey-Wyssling, Zürich.

#### B. Systemlehre und Pflanzengeographie

- 5a. Systematik und Stammesgeschichte der Pilze. Von Heinz Kern, dipl. Naturwiss., Zürich. (Mit 2 Abbildungen.)
- 5b. Systematik und Stammesgeschichte der Phanerogamen. Von Professor Dr. J. Mattfeld, Berlin-Dahlem.
6. Paläobotanik\*). Von Professor Dr. K. Mägdefrau, München.
7. Systematische und genetische Pflanzengeographie\*). Von Professor Dr. F. Firbas, Göttingen.
8. Ökologische Pflanzengeographie. Von Professor Dr. H. Walter, Stuttgart-Hohenheim. (Mit 3 Abbildungen.)
9. Ökologie. Von Professor Dr. Th. Schmucker, Hann. Münden.

#### C. Physiologie des Stoffwechsels

10. Physikalisch-chemische Grundlagen der biologischen Vorgänge\*). Von Professor Dr. E. Bünning, Tübingen.
11. Zellphysiologie und Protoplasmatik. Von Professor Dr. H.-J. Bogen, Marburg/Lahn.
12. Wasserumsatz und Stoffbewegungen. Von Professor Dr. B. Huber, München. (Mit 3 Abbildungen.)
13. Mineralstoffwechsel. Von Professor Dr. H. Burström, Lund (Schweden). (Mit 1 Abbildung.)
14. Stoffwechsel organischer Verbindungen I. (Photosynthese\*). Von Professor Dr. A. Pirson, Marburg-Lahn.
15. Stoffwechsel organischer Verbindungen II. Von Professor Dr. K. Paech, Tübingen.

#### D. Physiologie der Organbildung

16. Vererbung. Von Professor Dr. H. Marquardt, Freiburg i. Br. (Mit 2 Abbildungen.)
17. Zytogenetik\*). Von Professor Dr. J. Straub, Köln-Riehl.
18. Wachstum und Bewegung\*). Von Professor Dr. H. v. Guttenberg, Rostock.
19. Entwicklungsphysiologie\*). Von Dr. A. Lang, Montreal (Kanada).
20. Bakteriophagen. Von Dr. K. Weidel, Tübingen. (Mit 5 Abbildungen.)

\*) Der Beitrag folgt im Band XIV.

**Planta.** Archiv für wissenschaftliche Botanik. Unter Mitwirkung von E. Bünning, Tübingen, A. Ernst, Zürich, H. v. Guttenberg, Rostock, R. Harder, Göttingen, W. Schumacher, Bonn, G. Tischler, Kiel, herausgegeben von **Wilhelm Ruhland** und **Otto Renner**. Erscheint zur Ermöglichung rascher Veröffentlichungen zwanglos in einzeln berechneten Heften, die zu Bänden vereinigt werden.

Zu beziehen durch

**MINERVA, WISSENSCHAFTLICHE BUCHHANDLUNG GES. M. B. H., WIEN I**  
Verkaufsalokal: Schottenbastei 2 / Tel. U 27-0-47      Expedition: Mülkerbastei 5 / Tel. U 26-5-00

